

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Signaltransduktion  
Ajoen-induzierter Apoptose  
in Leukämiezellen**

Dorothee Antlsperger

aus

München

2002

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau Prof. Dr. Angelika M. Vollmar betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 8. April 2002



Dorothee Antlsperger

Dissertation eingereicht am:

1. Gutachter

2. Gutachter

Mündliche Prüfung am:

8. April 2002

Prof. Dr. A. M. Vollmar

Prof. Dr. A. Pfeifer

13. Mai 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der Ludwig-Maximilians-Universität München auf Anregung und unter Leitung von Frau

Prof. Dr. Angelika M. Vollmar

angefertigt.

Für die stets großzügige Förderung und Unterstützung dieser Arbeit danke ich Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar herzlich.

Frau Dr. Verena M. Dirsch spreche ich für die Betreuung der Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen meinen herzlichen Dank aus. In gleicher Weise danke ich Frau Dr. Alexandra K. Kiemer.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der LMU München, für die Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie und das außerordentliche Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und den daraus hervorgegangenen Anregungen.

Ferner gilt mein Dank:

Meinen Freunden und Kollegen im Arbeitskreis, die durch ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft ein ausgezeichnetes Arbeitsklima schufen, insbesondere J. Leikert, N. Bildner, Ch. Müller und I. Sönning, Herrn HP Keiß und T. Gerwig für die Unterstützung in EDV-Belangen. Frau R. Socher, dem „guten Geist“ unseres Labors, sei herzlich gedankt.

Herrn Dr. J. Krauß und Herrn Dr. R. Samtleben danke ich für ihre kollegiale Hilfe.

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Fragestellung .....	1
1.2	Übersicht .....	2
1.2.1	Begriffserklärung und physiologische bzw. ontologische Bedeutung der Apoptose .....	2
1.2.2	Morphologie des Apoptoseverlaufes, Unterschied zur Nekrose.....	3
1.2.3	Auswahl biochemischer Veränderungen im Verlauf der Apoptose .....	5
1.2.4	Caspasen, die Effektoren der Apoptose .....	6
1.2.4.1	Bau und Spezifität .....	6
1.2.4.2	Aktivierung .....	7
1.2.4.3	Einteilung .....	8
1.2.4.4	Substrate .....	8
1.3	Signaltransduktionswege in der Apoptose .....	9
1.3.1	Die rezeptorvermittelte Apoptose („Extrinsic Pathway“) .....	9
1.3.1.1	Der CD95-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktionsweg .....	10
1.3.1.1.1	Physiologische Bedeutung .....	10
1.3.1.1.2	Aufbau und Funktionsweise des CD95/CD95L-Systems .....	10
1.3.2	Mitochondrial vermittelte Apoptose .....	12
1.3.2.1	Bau und Funktion der Mitochondrien im Organismus .....	12
1.3.2.2	Mitochondrien in der Mitochondrien-vermittelten Apoptose .....	12
1.3.2.2.1	Änderungen an der inneren mitochondrialen Membran .....	13
1.3.2.2.2	Änderungen an der äußeren mitochondrialen Membran.....	13
1.3.2.3	Die Bcl-2 Familie .....	14
1.3.2.3.1	Historisches und Einteilung .....	14
1.3.2.3.2	Funktion und Wirkung .....	15
1.4	Mediatoren der Signaltransduktion.....	17
1.4.1.1	Reaktive Sauerstoffspezies.....	17
1.4.1.2	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen .....	18
1.4.1.2.1	Physiologische Bedeutung und Bedeutung in der Apoptose .....	18
1.5	Ajoen.....	19
1.5.1	Organoschwefelverbindungen im Knoblauch ( <i>Allium sativum</i> L.) .....	19
1.5.1.1	Organoschwefelverbindungen aus <i>Allium sativum</i> L.- Stand der Forschung .....	20
1.5.1.2	Ajoen .....	22
2	MATERIAL UND METHODEN .....	23
2.1	Zellkultur.....	23
2.1.1	Zelllinien .....	23
2.1.2	Zellkulturtechniken .....	24
2.1.2.1	Einfrieren von Zellen .....	24
2.1.2.2	Auftauen von Zellen .....	25
2.1.2.3	Bestimmung der Zellzahl und Aussäen von Suspensionszellen .....	25

2.1.3	Zellinkubation .....	25
2.1.3.1	Substanzen .....	25
2.1.3.2	Photometrische Bestimmung der Vitalität der Zellen .....	26
2.2	Durchflusszytometrie .....	27
2.2.1	Allgemeines zur Durchflusszytometrie .....	27
2.2.2	Anwendungen der Durchflusszytometrie .....	28
2.2.2.1	Charakterisierung von Form und Größe der Zellen .....	28
2.2.2.2	Messung der Zytotoxizität über den „Propidiumjodid-Ausschluss-Assay“ .....	29
2.2.2.3	Quantifizierung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie .....	29
2.2.2.4	Bestimmung der CD95-Rezeptorexpression .....	31
2.2.2.5	Messung des Membranpotentials der Mitochondrien mittels FACS .....	32
2.2.2.6	Messung der intrazellulären ROS-Generierung am Durchflusszytometer .....	33
2.3	Mikroskopie .....	35
2.3.1	Lichtmikroskopie .....	35
2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie .....	36
2.3.2.1	Detektion des kondensierten Chromatins mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	36
2.3.2.2	Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie .....	36
2.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	37
2.4	Detektion von Proteinen mittels Western Blot .....	37
2.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	38
2.4.2	Immunologischer Nachweis fixierter Proteine auf PVDF Membranen .....	40
2.4.3	Anfärben von Proteinbanden im Gel .....	43
2.4.4	Färbung von PVDF-Membranen .....	44
2.4.5	Ablösen von Antikörpern von PVDF-Membranen .....	45
2.4.6	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	45
2.4.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	45
2.4.6.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	46
2.4.7	Aufbereitung der Zellen für die Western Blot Analyse .....	47
2.4.7.1	Untersuchung der Cytochrom c-Freisetzung .....	47
2.4.7.2	Detektion von Bcl-2 Familienmitgliedern .....	50
2.4.7.3	Probenvorbereitung zur Detektion der Aktivierung von MAPK (JNK, p38, ERK1/2) und von Proteinkinase B/Akt .....	50
2.4.7.4	Probenvorbereitung zur Detektion der aktiven Spaltprodukte von Caspasen und zur Detektion von gespaltenem PARP .....	52
2.5	Nachweis von Transkriptionsfaktor AP-1 mittels Elektrophoretic-Mobility-Shift Assay (EMSA) .....	53
2.5.1	Vorbereitung für EMSA .....	53
2.5.2	EMSA .....	54

2.6	Nachweis der Caspase-3-ähnlichen Aktivität mittels DEVD-Spaltungsassays .....	54
2.7	Statistik.....	55
3	ERGEBNISSE .....	56
3.1	Ajoen induziert Apoptose .....	56
3.1.1	Morphologie .....	56
3.1.1.1	Lichtmikroskopisch erfassbare Veränderungen .....	56
3.1.1.2	Durchflusszytometrische Detektion morphologischer Veränderungen .....	57
3.1.1.3	Morphologische Veränderungen des Zellkerns .....	59
3.1.1.3.1	Nachweis der DNA-Kondensation im Fluoreszenzmikroskop .....	59
3.1.1.3.2	Detektion von Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt .....	60
3.1.2	Die Induktion der Apoptose durch Ajoen erfolgt konzentrations- und zeitabhängig .....	61
3.2	Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg .....	62
3.2.1	Ajoen induziert die Aktivierung von Caspasen .....	62
3.2.1.1	Nachweis der Caspase-3-ähnlichen Aktivität .....	62
3.2.1.2	Detektion der PARP-Spaltung.....	63
3.2.1.3	Die Ajoen-induzierte Apoptose verläuft abhängig von Caspasen .....	64
3.2.1.4	Welche Caspasen werden aktiviert? .....	64
3.2.2	Untersuchungen zur CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose .....	66
3.2.2.1	Expression des CD95-Rezeptors auf HL-60 Zellen .....	66
3.2.2.2	Spielt das CD95/CD95L-System in der Ajoen-induzierten Apoptose eine Rolle? .....	67
3.2.2.2.1	Einfluss von Ajoen auf die CD95-Rezeptorexpression.....	67
3.2.2.2.2	Untersuchungen zur Induktion der Apoptose mit CD95-Ligand .....	67
3.2.2.2.3	Apoptoseinduktion an CD95-resistenten Jurkat Zellen (Jurkat <sup>R</sup> ) .....	69
3.2.2.3	Notwendigkeit der Caspase-8 in der Ajoen-induzierten Apoptose .....	70
3.2.3	Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg über Mitochondrien.....	72
3.2.3.1	Veränderungen an der äußeren mitochondrialen Membran - Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien.....	72
3.2.3.1.1	Ausschluss einer mitochondrialen Kontamination in der Zytosolfraktion.....	73
3.2.3.2	Untersuchungen zu Veränderungen an der inneren mitochondrialen Membran.....	74
3.2.3.2.1	Durchflusszytometrische Analyse mittels JC-1.....	74
3.2.3.2.2	Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop .....	75
3.2.3.3	Die Cytochrom c-Freisetzung erfolgt unabhängig von aktivierten Caspasen .....	75
3.2.3.4	Die Rolle der Mitochondrien im Ajoen-induzierten Signalweg .....	76
3.2.3.4.1	Überexpression von Bcl-x <sub>L</sub> .....	77

3.2.3.4.2	Die Ajoen-induzierte Apoptose erfolgt Mitochondrien-kontrolliert.....	77
3.2.3.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von HL60/neo und HL-60/bcl-x <sub>L</sub> Zellen.....	81
3.2.3.5.1	Morphologische Unterschiede vor und nach Stimulation .....	82
3.2.3.5.2	Statistische Auswertungen struktureller Veränderungen.....	84
3.2.3.5.3	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse .....	86
3.2.4	Potentielle Mediatoren der mitochondrial vermittelten Signaltransduktion.....	87
3.2.4.1	Reaktive Sauerstoffspezies.....	87
3.2.4.1.1	Ajoen induziert zeitabhängig die Bildung von ROS .....	87
3.2.4.1.2	Die ROS-Bildung ist ein konzentrationsabhängiger Prozess .....	88
3.2.4.1.3	ROS sind wichtige Mediatoren in der Ajoen-induzierten Apoptose .....	88
3.2.4.1.4	Lokalisation der Entstehung von ROS .....	89
3.2.4.1.4.1	Versuche mit Bongkrekic-Säure und Rotenon .....	89
3.2.4.1.4.2	Untersuchungen zur ROS-Generierung in HL-60/bcl-x <sub>L</sub> Zellen .....	90
3.2.4.1.5	NAC unterdrückt die Aktivierung der Caspase-3.....	91
3.2.4.2	Involvierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen.....	92
3.2.4.2.1	Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 .....	92
3.2.4.2.2	Untersuchungen zur Aktivierung von MAPK .....	93
3.2.4.2.2.1	Aktivierung der JNK, p38 MAPK und der ERK1/2.....	93
3.2.4.2.3	Untersuchungen zur Aktivierung der JNK .....	95
3.2.4.2.3.1	JNK-Aktivierung „upstream“ oder „downstream“ der mitochondrialen Ereignisse? .....	95
3.2.4.2.3.2	Ist die Aktivierung der JNK für den Ajoen-induzierten Zelltod notwendig?.....	97
3.2.4.2.4	Bedeutung der p38 MAPK im Signaltransduktionsweg.....	99
3.2.4.2.5	Die Rolle der ERK1/2 .....	100
3.2.4.3	Proteinkinase B/Akt.....	102
3.2.4.3.1	Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Ajoen .....	102
3.2.4.3.2	Bedeutung der Akt-Aktivierung für die Ajoen-induzierte Apoptose....	103
3.2.4.4	Zusammenfassung zum Kapitel 3.2.4 .....	104
4	DISKUSSION .....	106
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	121
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	123
7	ANHANG .....	134
8	LEBENS LAUF .....	145

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Ablauf der Apoptose. ....	4
Abb. 2: Apoptose im Vergleich zur Nekrose. ....	5
Abb. 3: Darstellung der Caspase-8 und -3 Zymogene. ....	7
Abb. 4: Apoptoseinduktion über das CD95/CD95L-System. ....	11
Abb. 5: Einteilung der Bcl-2 Familienmitglieder (Auswahl). ....	15
Abb. 6: Zusammenfassung Apoptoseinduktion in Typ I und Typ II Zellen. ....	16
Abb. 7: Die MAPK-Kaskade. ....	19
Abb. 8: Übersicht der Entstehung diverser Schwefel-enthaltender Verbindungen im Knoblauch nach Alliinase-Freisetzung .....	20
Abb. 9: Struktur der nichtwirksamen und hochwirksamen OSV auf Leukämiezellen. ....	22
Abb. 10: Strukturformel von Ajoen. ....	22
Abb. 11: Funktion des Durchflusszytometers (schematisch) zur Bestimmung der Form und Größe der Zellen. ....	28
Abb. 12: Chemische Struktur von JC-1. ....	33
Abb. 13: ECL-Detektion .....	42
Abb. 14: Flussschema der Cytochrom c-Bestimmung. ....	49
Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Zellen. ....	57
Abb. 16: Morphologische Veränderungen detektiert mittels FACS. ....	58
Abb. 17: Detektion der kondensierten DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie. ....	59
Abb. 18: Durchflusszytometrische Darstellung des DNA-Gehaltes der Zellen. ....	60
Abb. 19: Zeitabhängige Induktion der Apoptose in HL-60 Zellen durch Ajoen. ....	61
Abb. 20: Konzentrationsabhängige Induktion des Zelltodes durch Ajoen. ....	62
Abb. 21: Bestimmung der Caspase-3-ähnlichen Aktivität. ....	63
Abb. 22: Ajoen induziert zeitabhängig die Spaltung von PARP. ....	63
Abb. 24: Ajoen induziert die Aktivierung der Procaspase-3. ....	65
Abb. 25: Ajoen induziert die Aktivierung der Procaspase-8. ....	65
Abb. 26: HL-60 Zellen exprimieren den CD95-Rezeptor. ....	66
Abb. 27: Immunfluorimetrische Analyse der CD95-Rezeptorexpression. ....	67
Abb. 28: CD95L induziert keine Apoptose in HL-60 Zellen. ....	68
Abb. 29: Ajoen hat keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion. ....	69
Abb. 30: Ajoen (20 µM) induziert Apoptose auch in CD95-resistenten Jurkat Zellen (Jurkat <sup>R</sup> ). ....	70
Abb. 31: Die Aktivierung der Caspase-8 hat keinen Einfluss auf die Ajoen- induzierte Apoptose. ....	71
Abb. 32: Ajoen verursacht eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. ....	73
Abb. 33: Die zytosolische Fraktion ist frei von mitochondrialer Kontamination. ....	73

Abb. 34: Durchflusszytometrische Erfassung des mitochondrialen Membranpotentials.....	74
Abb. 35: Ajoen induziert einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.....	75
Abb. 36: Die Cytochrom c-Freisetzung erfolgt unabhängig von Caspasen.....	76
Abb. 37: Mitochondriale Expression von Bcl-x <sub>L</sub> in HL-60 Zellen, HL-60/neo und HL-60/bcl-x <sub>L</sub> Zellen.....	77
Abb. 38: Bcl-x <sub>L</sub> schützt vor Ajoen-induzierter Apoptose.....	78
Abb. 39: Die Aktivierung der Caspase-3 und-8 erfolgt „downstream“ der mitochondrialen „Aktivierung“.....	80
Abb. 40: Der Schutz durch Bcl-x <sub>L</sub> ist kein zelltypabhängiges Phänomen. ....	81
Abb. 41: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten.....	83
(ca. 7 nm Schichtdicke) von HL-60/neo Zellen.....	83
Abb. 42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten von HL-60/bcl-x <sub>L</sub> Zellen.....	84
Abb. 43: Statistische Auswertung der morphologischen Untersuchungen.....	85
Abb. 44: Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse. ....	86
Abb. 45: Zeitabhängige Erhöhung der Peroxidbildung durch Ajoen in HL-60 Zellen. ....	87
Abb. 46: Ajoen induziert konzentrationsabhängig die Bildung von ROS.....	88
Abb. 47: NAC verhindert die Ajoen-induzierte ROS-Bildung.....	89
Abb. 48: Mitochondrien scheiden als Quelle der ROS aus.....	90
Abb. 49: ROS-Bildung in HL-60/bcl-x <sub>L</sub> Zellen nach Ajoen-Stimulation.....	91
Abb. 50: Die Ajoen-induzierte ROS-Entstehung liegt „upstream“ der Mitochondrien-abhängigen Caspaseaktivierung. ....	92
Abb. 51: Ajoen induziert die Aktivierung von AP-1, NAC verhindert die Aktivierung. ....	93
Abb. 52: Ajoen induziert die Aktivierung der MAPK JNK, p38 und ERK1/2.....	94
Abb. 53: Die JNK-Aktivierung erfolgt unabhängig von der mitochondrialen „Aktivierung“ und unabhängig von aktivierten Caspasen. ....	96
Abb. 54: Ajoen induziert nicht die Phosphorylierung von Bcl-2.....	97
Abb. 55: Einfluss von SB 203580 auf die Aktivierung der JNK und die Apoptoserate.....	98
Abb. 56: Induktion der Apoptose in HL-60/DN-JNK versus HL-60 Zellen durch Ajoen.....	99
Abb. 57: p38 MAPK ist nicht im Ajoen-induzierten Signaltransduktionsweg involviert. ....	100
Abb. 58: Die Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung erhöht die Ajoen-induzierte Apoptose. ....	101
Abb. 59: Ajoen aktiviert die Proteinkinase B/Akt.....	103
Abb. 60: Akt ist nicht in der Ajoen-induzierten Apoptose involviert. ....	104
Abb. 61: Ergebnisübersicht.....	122

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Caspasen (nach Erkennungssequenz und Substraten). .....	9
Tabelle 2: Zusammenstellung der antineoplastischen/antitumoralen Wirkung einiger Organoschwefelverbindungen. ....	21
Tabelle 3: Verwendete Suspensionszelllinien und Zusätze. ....	24
Tabelle 4: Zur (Vor-) Inkubation verwendete Substanzen. ....	26
Tabelle 5: Färbemittel. ....	26
Tabelle 6: Bestimmungen der Apoptoserate nach Nicoletti et al. ....	31
Tabelle 7: Experimente zur ROS-Generierung am FACS. ....	35
Tabelle 8: Probenpuffer für Western Blot. ....	38
Tabelle 9: Trenngel. ....	39
Tabelle 10: Sammelgel. ....	39
Tabelle 11: Elektrophoresepuffer. ....	39
Tabelle 12: Anodenpuffer I. ....	40
Tabelle 13: Anodenpuffer II. ....	40
Tabelle 14: Kathodenpuffer. ....	40
Tabelle 15: Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween. ....	42
Tabelle 16: Zum immunologischen Nachweis verwendete Antikörper (Western Blot). ....	43
Tabelle 17: Coomassie Färbelösung und Entfärbelösung. ....	44
Tabelle 18: Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry. ....	46
Tabelle 19: Permeabilisierungspuffer zur Cytochrom c-Bestimmung. ....	47
Tabelle 20: Lysepuffer zur Detektion der Aktivierung von MAPK (JNK, p38, ERK1/2) und von Proteinkinase B/Akt. ....	51
Tabelle 21: Verwendete Zelllinien, vorinkubierte Substanzen für die Western Blot Analyse. ....	52
Tabelle 22: Lysepuffer für die Caspasenaufarbeitung (Western Blot Analyse). ....	52
Tabelle 23: Puffer für die Nucleipräparation. ....	53
Tabelle 24: Lysepuffer zur Bestimmung der Caspase-3-ähnlichen Aktivität. ....	55

# Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis-Inducing Factor, Apoptose-induzierender Faktor
AML	Akute myeloische Leukämie
ANT	Adenin-Nucleotid-Translokator
AP-1	Activator-Protein-1, Aktivator-Protein-1
Apaf-1	Apoptosis Protease Activating Factor-1; apoptotische Protease aktivierender Faktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BA	Bongkrekic-Säure
Bax	Bcl-2 assoziiertes Protein X
Bcl	break cluster locus point (Genort für Follikularlymphom)
BH	Bcl-2 homologe Domäne
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
CD95/CD95L	CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System
CD95	Cell Death Receptor 95, Todesrezeptor 95
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DD	Death Domain, Todesdomäne
DED	Death-Effector Domain, Todes-Effektor Domäne
DHR-123	Dihydrorhodamin-123
DISC	Death-Inducing Signaling Komplex, Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	[Ethylene-bis(oxyethylenitrilo)]tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazellulär Regulierte Kinase 1/2
F	Lipidkörperchen
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter, Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortiersystem
FADD	Fas-Associated Death Domain; Fas-assozierte Todesdomäne
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FL-1/FL-2	Fluoreszenzkanal 1 bzw. 2
FSC/SSC	Forward scatter/Side scatter, Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht
G418	Geneticinsulfat
GTP	Guanosin-triphosphat
H 9	H 9 Zelllinie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HL-60	humane akut-myeloisch leukämische Zelllinie
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid
JNK	c-Jun-terminale Kinase
Jurkat <sup>R</sup>	CD95-resistente Jurkat Zelllinie
Jurkat Zellen	leukämische T-Zelllinie



M	Mitochondrium
MAPK	Mitogen-Activated Protein-Kinases, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
OSV	Organoschwefelverbindungen
PAA	Polyacrylamid
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4
PBS-T	PBS mit Tween
PCD	Programmed Cell Death, programmierter Zelltod
PHA	Phytohämagglutinin A
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PT	Permeability Transition, Permeabilitätsänderung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Ribosomen und Polysomen
Ro	Rotenon
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
t-Bid	truncated Bid, geschnittenes Bid
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung, pH 8,0 mit Tween
TEM	Transmissionselektronenmikroskop/-ie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VDAC	Voltage-Dependent-Anion Channel, spannungsabhängiger Anionenkanal
ZK	Zellkern
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Fragestellung

Krebs wird laut aktueller Prognosen in 10 bis 20 Jahren den Herz-Kreislaufkrankheiten den Rang als statistisch erste Todesursache in den Industrieländern ablaufen (Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 2000). Prävention und Früherkennung von Krebs, aber auch Therapiemaßnahmen sind daher mehr denn je im Blickpunkt der Forschung. Auf dem Therapiesektor bemüht man sich um Aufklärung der Mechanismen der Krebsentstehung, um damit auch in der Krebsbekämpfung entscheidende Schritte vorwärts zu kommen. Besondere Aufmerksamkeit gilt der Erforschung des programmierten Zelltodes (Apoptose).

Knoblauch (*Allium sativum* L.), Zwiebel (*Allium cepa* L.) oder Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* P.) schreibt man chemopräventive Eigenschaften zu, die insbesondere durch die enthaltenen organischen Schwefelverbindungen (OSV) bedingt sein sollen. Diese induzieren eine erhöhte Aktivität der detoxifizierenden Phase II Enzyme. Darüber hinaus weist man den OSV, wie Diallyldisulfid <sup>1</sup>, Allicin <sup>2,3</sup> oder Ajoen <sup>4,5</sup> eine zytotoxische Wirkung zu.

Unser Interesse galt speziell Ajoen, einer Organoschwefelverbindung aus *Allium sativum* L.. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass Ajoen in einer akut promyeloischen Leukämiezelllinie (HL-60 Zellen) Apoptose auslösen kann und damit ein antitumorales Potential besitzt <sup>5</sup>.

Die vorliegende Arbeit setzte sich das Ziel, den Mechanismus der Signaltransduktion der Ajoen-induzierten Apoptose aufzuklären und dabei wichtige Methoden zur Aufklärung des Mechanismus in vitro, an Zellkulturlinien, zu etablieren.

Folgende Fragen standen dabei im Mittelpunkt:

1. Verläuft die Ajoen-induzierte Apoptose rezeptorvermittelt (extrinsischer Signalweg)?
2. Sind die Mitochondrien für die Signaltransduktion notwendig (intrinsischer Signalweg)?

3. Was führt gegebenenfalls zur „Aktivierung“ der Mitochondrien? Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und der Proteinkinase B/Akt.

## 1.2 Übersicht

### 1.2.1 Begriffserklärung und physiologische bzw. ontologische Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts durch Collin et al.<sup>6</sup> entdeckt, jedoch erst in den 70er Jahren durch Kerr, Wyllie und Currie<sup>7</sup> eingehend beschrieben. Der Begriff „Apoptose“ stammt aus dem griechischen  $\alpha\pi\omicron$  = herab und  $\pi\tau\omicron\sigma\iota\varsigma$  = fallen, symbolhaft für das Abfallen der verwelkten Blätter von den Bäumen. Ein oft mit der Apoptose synonym gebrauchter Begriff ist der programmierte Zelltod (PCD, programmed cell death), ein aus der Entwicklungsbiologie stammender Begriff: Überflüssige (nicht mehr gebrauchte) Zellen sterben in der Embryogenese geordnet und genetisch gesteuert ab: zum Beispiel sterben bei der Entwicklung der Finger die überflüssigen Zellen im Interdigitalraum ab<sup>8</sup>. Aber auch im fertig entwickelten Organismus ist PCD oder Apoptose zur Gewebserneuerung nötig. Ein Beispiel ist die Elimination von nicht mehr gebrauchten Zellen nach einer Immunantwort<sup>9</sup>. Ferner ist die hormonell regulierte Regression des Endometriums, das durch Absterben und Erneuerung von Zellen geprägt ist, zu nennen<sup>10</sup>.

Generell kann man sagen: PCD ist ein notwendiger Bestandteil der gesunden Entwicklung eines vielzelligen Organismus sowie der Gewebshomöostase. Zwei Prozesse garantieren die Gewebshomöostase eines Organismus: Zellneubildung (Proliferation) und Zelltod, die im Gleichgewicht zueinander stehen.

Eine Störung der Gewebshomöostase ist an vielen pathologischen Zuständen beteiligt, wie z.B. bei Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer. Hier liegen wahrscheinlich erhöhte Apoptoseraten spezifischer Neuronen vor<sup>11</sup>. Aber auch Autoimmunkrankheiten, wie z.B. die rheumatische Arthritis werden im Zusammenhang mit einer Störung der Apoptose diskutiert<sup>12</sup>.

Die Aufgabe der Apoptose ist allgemein die „störungsfreie“ Eliminierung von überflüssigen, schadhaften bzw. entarteten Zellen (ohne Entzündungsreaktion). Dazu laufen Regulationsmechanismen ab, die zum

Absterben der Zelle, bei maximalem Recycling der Zellbausteine, führen. Aus dieser Sicht ist „ein zu wenig“ an Zelltod von überalterten oder schadhafte Zellen eine Ursache der Krebsentstehung.

In der Vergangenheit stand im Zusammenhang mit der Tumorentstehung das vermehrte Zellwachstum im Vordergrund. Der Prozess, der den Tod defekter Zellen herbeiführt, die Apoptose, war noch nicht ins Bewusstsein gerückt. In der Krebsbekämpfung hat die Apoptose in den letzten 10-15 Jahren steigende Aufmerksamkeit erhalten, da als eine Ursache der Tumorentstehung ein Fehler in der Auslösung oder im Ablauf dieses programmierten Zelltodes vorstellbar ist: Tumorzellen haben verlernt zu sterben.

### **1.2.2 Morphologie des Apoptoseverlaufes, Unterschied zur Nekrose**

Kerr, Wyllie und Curry beschrieben 1972<sup>7</sup> als erstes die Vorgänge während der Apoptose. Sie beobachteten, wie Zellen, die physiologischen oder pathologischen Stimuli ausgesetzt waren, morphologische Veränderungen durchlaufen. Charakteristischerweise betrifft die Apoptose eine einzelne Zelle in einem Gewebeverband. Sie löst sich von ihren Nachbarn, wird rund und beginnt an der Oberfläche zu „kochen“, d.h. Bläschen bilden sich aus, die wieder vergehen. An anderer Stelle treten neue Bläschen auf. Die Zelle schrumpft und schnürt schließlich Vesikel, kleine membranumhüllte Körperchen ab, die sogenannten „apoptotic bodies“. Diese enthalten Zytosol und teilweise Kernfragmente. Aufgrund elektronenmikroskopischer Studien kann der Vorgang in zwei Stufen eingeteilt werden: 1. Bildung der apoptotischen Körperchen und 2. deren Phagozytose oder Degradierung durch andere Zellen. Als weitere charakteristische Veränderung sind die Abläufe im Kern zu nennen: das Chromatin im Zellkern, sonst locker verteilt, beginnt sich zu verdichten (zu kondensieren), bis der Kern schließlich fragmentiert.

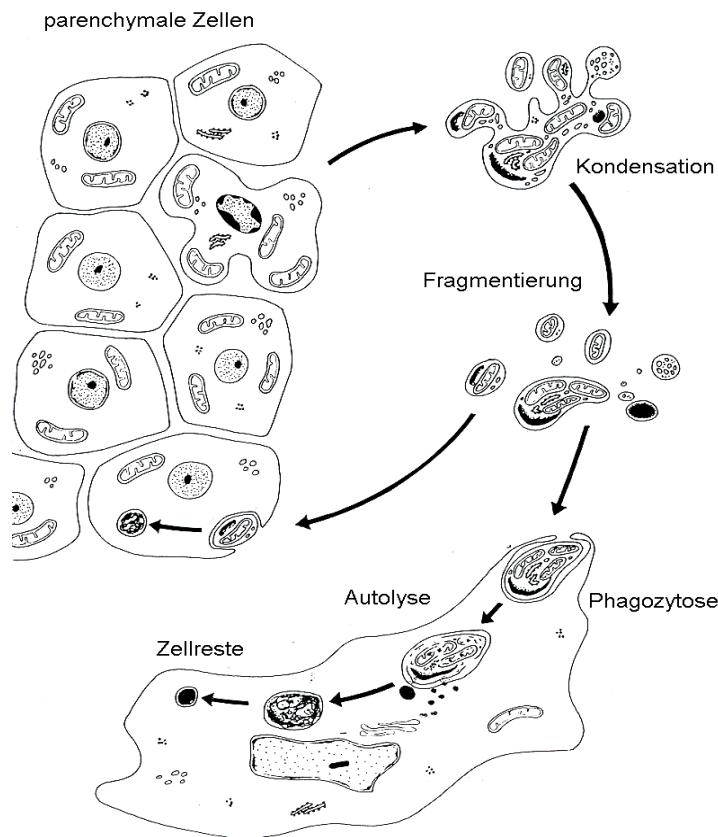


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Apoptose (modifiziert nach Kerr et al., 1972<sup>7</sup>). Eine parenchymale Zelle separiert sich aus dem Zellverband, die Zelle beginnt zu „brodeln“, das Chromatin kondensiert, es werden kleine membranumhüllte Körperchen abgeschnürt. Die fragmentierte Zelle wird von ihren Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert.

Morphologisch lässt sich der apoptotische Zelltod gut vom nekrotischen Zelltod unterscheiden: bei der Nekrose ist nicht eine einzelne Zelle betroffen sondern ganze Zell-(Gewebe-)verbände. Der Tod wird durch einen „Unfall“ hervorgerufen. In Folge von z.B. Hypoxie (beim Herzinfarkt) oder durch Toxine verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, den Wasser- und Elektrolythaushalt zu steuern. Sie beginnen zu quellen bis sie bersten. Dadurch tritt Zellinhalt aus und Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. Bei der Nekrose ist die einsetzende Entzündungsreaktion der umliegenden Zellen eine charakteristische Erscheinung. Bei der Apoptose fehlt diese gänzlich. Während die Apoptose ein regulierter, aktiver und energieabhängiger Prozess ist, verläuft die Nekrose passiv.

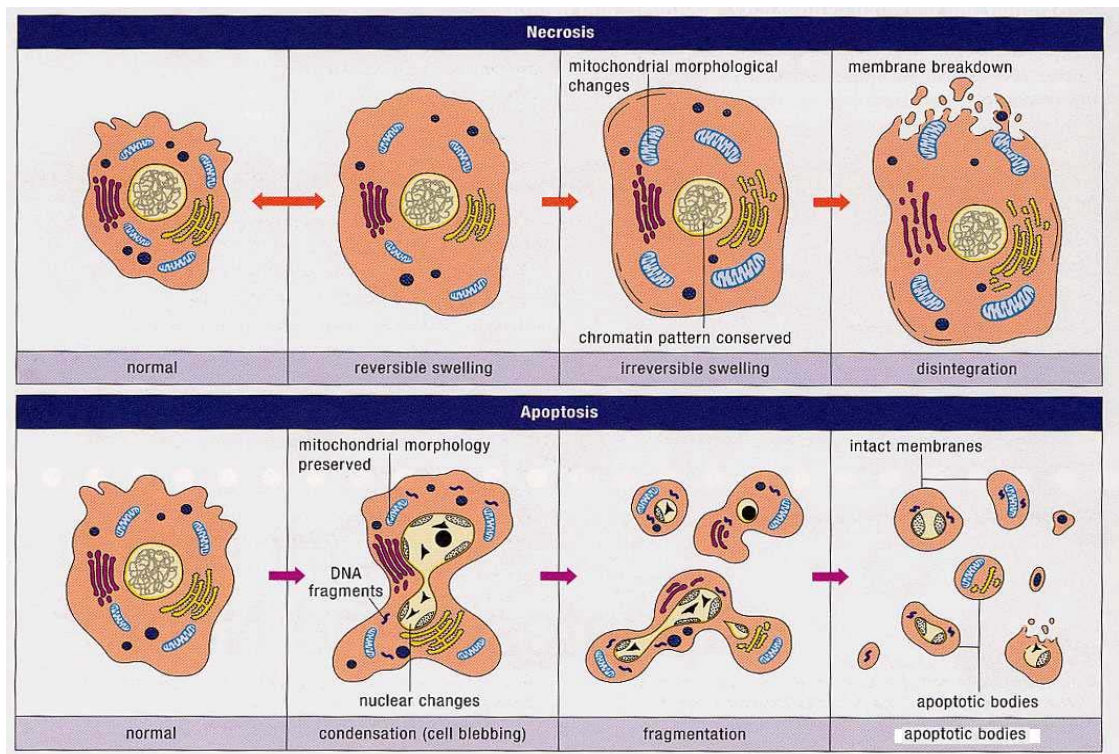


Abb. 2: Apoptose im Vergleich zur Nekrose.  
(modifiziert aus: *Apoptosis and Cell Proliferation*, 2<sup>nd</sup> Edition, Boehringer Mannheim).

Nekrose und Apoptose können nebeneinander vorkommen. Sie lassen sich aber nicht nur morphologisch, sondern auch biochemisch voneinander unterscheiden.

### 1.2.3 Auswahl biochemischer Veränderungen im Verlauf der Apoptose

#### 1. Caspase-Aktivierung:

Caspasen sind Enzyme, die im Verlauf der Apoptose aktiviert werden. Sie sind für die auftretenden morphologischen Veränderungen mitverantwortlich. **Caspasen** sind **C**ysteinproteasen, die nach **A**spartateinheiten spalten (daher ihr Name). Sie liegen als inaktive Vorläufer (Zymogene) in der Zelle vor und werden durch verschiedene Stimuli aktiviert<sup>13</sup>. Die Aktivierung geschieht autokatalytisch oder durch Spaltung durch andere Caspasen. Der Nachweis der Aktivierung erfolgt mittels Aktivitätsassays<sup>14</sup> oder durch immunologischen Nachweis der Spaltprodukte.

## 2. PARP-Spaltung:

Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein DNA-Reparaturenzym, dessen Expression durch DNA-Strangbrüche ausgelöst wird. PARP ist ein Substrat aktivierter Caspasen und wird durch diese im Verlauf der Apoptose gespalten<sup>15</sup>.

## 3. Charakteristische DNA-Fragmentierung:

Caspasen aktivieren andererseits Endonukleasen, die im Verlauf der Apoptose die DNA charakteristisch fragmentieren. Endonukleasen schneiden zwischen zwei Nukleosomen nach ca. 180 Basenpaaren oder Vielfachen davon. Trennt man die DNA von apoptotischen Zellen gelelektrophoretisch auf, so erhält man ein leiterartiges Muster mit Fragmenten einer charakteristischen Größenverteilung, die sog. DNA-Leiter<sup>16</sup>.

## 4. DNA-Kondensation:

Die Verdichtung des Chromatins und die anschließende Kernfragmentierung ist ein weiteres Indiz für apoptotische Vorgänge in der Zelle. Das locker verteilte Chromatin beginnt zu kondensieren, fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar durch Anfärben mittels fluoreszierender DNA-Interkalatoren (z.B. DAPI).

### 1.2.4 Caspasen, die Effektoren der Apoptose

#### 1.2.4.1 Bau und Spezifität

Die von Kerr et al.<sup>7</sup> beobachteten morphologischen Veränderungen sind durch Cysteinproteasen verursacht, die speziell bei apoptotischen Vorgängen aktiviert werden. Während der Evolution blieben Caspasen hoch konserviert. Sie sind ausgehend von Hydra (Süßwasserpolyt, Hydracea) über Insekten und Würmern bis zum Menschen zu finden. Heute kennen wir mehr als 14 verschiedene Caspasen. Davon werden zwei Drittel funktionell der Apoptose zugeordnet<sup>17</sup>. Caspasen ähneln sich in ihrer Aminosäure-Sequenz, in ihrer Struktur- und Substrat-Spezifität<sup>13</sup>. Sie besitzen einen katalytischen Cysteinrest innerhalb eines konservierten QACXG-Motivs (GluAlaCysXGly), welches bei der Interaktion mit dem Substrat und bei der enzymatischen

Spaltung von Bedeutung ist. Alle Caspasen schneiden Peptide nach Aspartat-Einheiten<sup>18</sup>. Ihre Spezifität richtet sich sowohl nach der vorangegangenen Aminosäuresequenz als auch nach der Tertiärstruktur des Substrat-Polypeptides. Caspase-1 schneidet z.B. nach YVAD-Sequenzen (TyrValAlaAsp), während Caspase-3 nach DEVD-Einheiten (AspGluValAsp) schneidet<sup>19</sup>.

#### 1.2.4.2 Aktivierung

Die meisten Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert. Diese Zymogene bestehen aus drei Domänen: der N-terminalen Domäne, einer großen Untereinheit (lg) mit dem aktiven Cystein-Rest und dem konservierten QACXG-Motiv, und einer C-terminalen kleinen Einheit (sm)<sup>17,20</sup>. Caspasen werden durch Spaltung aktiviert. Dabei wird im ersten Schritt das Zymogen in eine kleine und eine große Untereinheit gespalten. Im zweiten Schritt erfolgt die Abspaltung der N-terminalen Domäne. In allen bisher untersuchten Fällen ist die aktive Caspase ein Heterotetramer (Dimer) aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, und sie besitzt zwei aktive Zentren<sup>20,21</sup>.

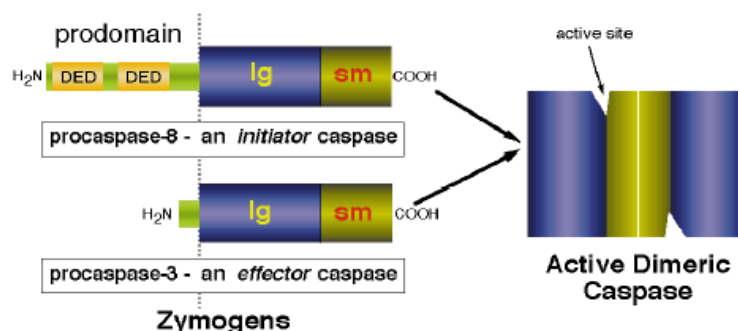


Abb. 3: Darstellung der Caspase-8 und -3 Zymogene.

Die Abbildung zeigt die Struktur der Zymogene von Caspase-8, einer Initiatorcaspase und Caspase-3, einer Effektorcaspase. Die aminoterminalen Prodomänen erscheinen hellgrün, große Untereinheiten in blau, kleine Untereinheiten in grün. Die Prodomäne der Caspase-8 enthält zwei Todeseffektordomänen (DED, Death Effector Domain). Das heterotetramere Enzym (rechts) entsteht durch proteolytische Spaltung (s. Text). lg = large subunit, sm = small subunit (aus Earnshaw et al., 1999<sup>22</sup>).

Die einfachste Möglichkeit der Aktivierung besteht in der Spaltung einer Procaspase durch eine bereits aktive Caspase, z.B. geschieht diese Form der Aktivierung bei Caspase -3, -6, -7<sup>17</sup>. Auch eine autokatalytische Aktivierung der Caspasen ist möglich und erfolgt z.B. bei den Initiatorcaspasen Caspase-



8 und -9<sup>17,23</sup>. Durch diese Möglichkeiten kann sich eine Hierarchie aufbauen, welche in einer Kaskade aus Proteaseaktivität endet.

#### 1.2.4.3 Einteilung

Die Caspasenfamilie teilt sich in pro-apoptotische und inflammatorische Caspasen (ICE, Interleukin-Converting Enzyme) auf. Die pro-apoptotischen werden weiter in die Initiator- und die Effektorcaspasen unterteilt.

Initiatorcaspasen sind durch eine große Prodomäne mit „Rekrutierungsmodulen“ wie DED (Death Effector Domain, s.a. Abb. 4, z.B. bei Caspase-8) oder CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain bei Caspase-9) charakterisiert<sup>22</sup>.

Effektorcaspasen besitzen eine kleine Prodomäne und sind im Verlauf der Apoptose hierarchisch weiter unten angesiedelt (sog. „downstream“ Caspasen), wie z.B. Caspase-3<sup>24</sup>. Die Einteilung kann auch nach anderen Gesichtspunkten erfolgen, z.B. aufgrund ihrer optimalen Spaltungssequenz (Tabelle 1).

#### 1.2.4.4 Substrate

Caspasen greifen im Verlauf der Apoptose weitere Proteine an, wie z.B. Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), DNA Proteinkinase, Fodrin, Lamin A und B, Proteinkinase A und C, Aktin u.a.. Unklarheit herrscht noch darüber, ob einige dieser Proteine für den Ablauf der Apoptose gespalten werden müssen oder ob diese Proteine nebenher ohne eigentlichen Zweck für den Verlauf gespalten werden<sup>19</sup>.

Trotzdem kann im Einzelfall die Spaltung eines Proteins als ein Marker der Caspaseaktivierung und der ablaufenden Apoptose benutzt werden. Ein Beispiel hierzu ist die Spaltung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase, ein DNA-Reparaturenzym: PARP-Spaltung ist für den Ablauf der Apoptose nicht essentiell, aber doch sinnvoll: einerseits wird ATP und NAD<sup>+</sup> „gespart“, das sonst für die PARP-Aktivität gebraucht würde und nun für den energieverbrauchenden Prozess der Apoptose zur Verfügung steht<sup>25</sup>, andererseits greift die PARP-Spaltung in die Aufgabe von PARP ein, nämlich die des Reparaturenzyms<sup>26</sup>. Dies erleichtert im Endeffekt den Vorgang der Apoptose. Die Detektion von gespaltenem PARP dient experimentell als Indikator für Caspase-3 Aktivität<sup>15</sup>.

Einteilung der Caspasen				
Caspase-Gruppe <sup>a</sup>	Mitglieder	Klasse <sup>b</sup>	Erkennungssequenz	Caspase-Substrate
Gruppe I	Caspase-1	Klasse I	YVAD/WEHD	ProIL-1 $\beta$ , proIL-18
	Caspase-4	Klasse I	W oder LEHD	
	Caspase-5	Klasse I	W oder LEHD	
	Caspase-11	Klasse I		
Gruppe II	Caspase-2	Klasse I	DEHD	PARP, DFF, DNA-PKcs u.a.
	Caspase-3	Klasse II	DEVD	
	Caspase-7	Klasse II	DEVD	
Gruppe III	Caspase-6	Klasse II	VEID	Lamin
	Caspase-8	Klasse I	L oder VETD	
	Caspase-9	Klasse I	LEHD	Caspase-3
	Caspase-10	Klasse I		

<sup>a</sup> Caspasen eingeteilt auf der Basis ihrer Erkennungssequenz

Gruppe I bevorzugt W/LEXD, Gruppe II DEXD, Gruppe III L/VEXD, bei Caspase-10 und- 11 ist sie bis dato nicht bekannt.

<sup>b</sup> Caspasen eingeteilt aufgrund der Länge ihrer Prodomäne, Klasse I mit großen Prodomänen, Klasse II mit kurzen oder keinen Prodomänen.

DNA-PKcs: DNA-dependent Proteinkinase, DFF: DNA-Fragmentation Factor; ProIL-1 $\beta$ : Pro-Interleukin-1 $\beta$ .

**Tabelle 1: Einteilung der Caspasen nach Erkennungssequenz und Substraten (nach Kumar, 1998<sup>27</sup>).**

## 1.3 Signaltransduktionswege in der Apoptose

Apoptose ist ein streng regulierter Vorgang. Bis heute haben sich im wesentlichen zwei Signaltransduktionswege in der Apoptose herausgeschält:

- 1) der todesrezeptorvermittelte Signalweg („extrinsic“, extrinsisch) und
- 2) der rezeptor-unabhängige, mitochondriale Signaltransduktionsweg („intrinsic“, intrinsisch).

Diese zwei Signalwege können jedoch nicht streng voneinander getrennt gesehen werden. Beide „Pathways“ können über Quervernetzungen miteinander kommunizieren („crosstalk“)<sup>28</sup>.

### 1.3.1 Die rezeptorvermittelte Apoptose („Extrinsic Pathway“)

Bis heute wurden verschiedene Todesrezeptoren gefunden. Sie gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie<sup>24</sup>. Diese umfasst z.B. TNF-R1, TNF-R2, CD95 (Fas, APO-1) und die TRAIL-Rezeptoren (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptors). Dabei spielt v.a. der CD95-Rezeptor

bei der Induktion des apoptotischen Signals eine bedeutsame Rolle. Das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System (CD95/CD95L) ist das bis heute am besten charakterisierte Todesrezeptormodell<sup>29-34</sup>.

Im Folgenden wird die rezeptorvermittelte Apoptose am Beispiel des CD95-Rezeptorsystems näher erläutert:

#### 1.3.1.1 Der CD95-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionsweg

##### 1.3.1.1.1 Physiologische Bedeutung

Der CD95/CD95L-vermittelte Weg hat einen großen Anteil an der Entwicklung und Funktion des Immunsystems<sup>29</sup>. Über dieses System werden z.B. T-Zellen (auch autoreaktive) im Thymus selektiv eliminiert. Ebenso kommen aktivierte Lymphozyten nach einer Immunantwort spezifisch durch Induktion der Apoptose zur Aussonderung. Weiterhin werden auf diesem Wege z.B. virusinfizierte oder entartete Zellen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen eliminiert. Die Entstehung von Autoimmunität nach Mutationen des fas oder fasL-Gens (kodiert für CD95 bzw. CD95L) veranschaulicht die Bedeutung des CD95/CD95L-Systems in der Immunantwort<sup>35,36</sup>.

##### 1.3.1.1.2 Aufbau und Funktionsweise des CD95/CD95L-Systems

CD95, früher auch Fas oder APO-1 genannt, ist durch eine membranständige, extrazelluläre cysteinreiche (2-5 Cysteinreste) Domäne charakterisiert. Die Todesrezeptoren besitzen eine homologe zytoplasmatische Sequenz, die Todesdomäne (DD, Death Domain). Die natürlichen Liganden dieser Rezeptoren gehören zur Familie der Tumornekrosefaktoren (CD95-Ligand, CD95L bzw. FasL). Sie sind frei beweglich oder an Oberflächen anderer Zellen gebunden. Die Todesdomänen (DD) werden für die Fähigkeit des Rezeptors, apoptotische Signale auszulösen, als notwendig angesehen. Die Bindung von freien oder zellassoziierten CD95L an CD95-Rezeptoren führt zur Trimerisierung der Rezeptoren und zur räumlichen Annäherung der Todesdomänen DD. Über diese DD kommt es nachfolgend zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas-Associated Death Domain). FADD-Adapter-Moleküle besitzen ihrerseits neben der DD eine DED (Death Effector Domain), die sich mit einer analogen Domäne der Procaspase-8 verbindet. Der Komplex aus DD (aus Todesrezeptor), FADD und Procaspase-8 bildet

den DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Am DISC erfolgt die autokatalytische Spaltung der Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8<sup>28</sup>. In sog. Typ I Zellen<sup>37</sup>, z.B. H 9 Zellen, erfolgt eine starke Aktivierung der Caspase-8 am DISC. Dies führt zur Aktivierung von Effektorcaspasen (auch sog. „downstream“ Caspasen) wie z.B. der Caspase-3, die wiederum weitere Caspasen aktiviert und zytoplasmatische und nukleäre Substrate spaltet. In Typ II<sup>37</sup> Zellen, z.B. HL-60 Zellen, wird nur wenig Caspase-8 am DISC aktiviert. Die Signaltransduktion bedarf deshalb einer Verstärkung über Mitochondrien. Dafür spaltet Caspase-8 Bid zu t-Bid (truncated Bid), welches schließlich die Mitochondrien „aktiviert“<sup>38</sup> (s.a. Kapitel 1.3.2). „Mitochondrienaktivierung“ nach CD95L-Exposition erfolgt in beiden Zelltypen, doch in Typ I Zellen ist ihre „Aktivierung“ nicht zur Apoptoseinduktion nötig (s.a. Abb. 6).

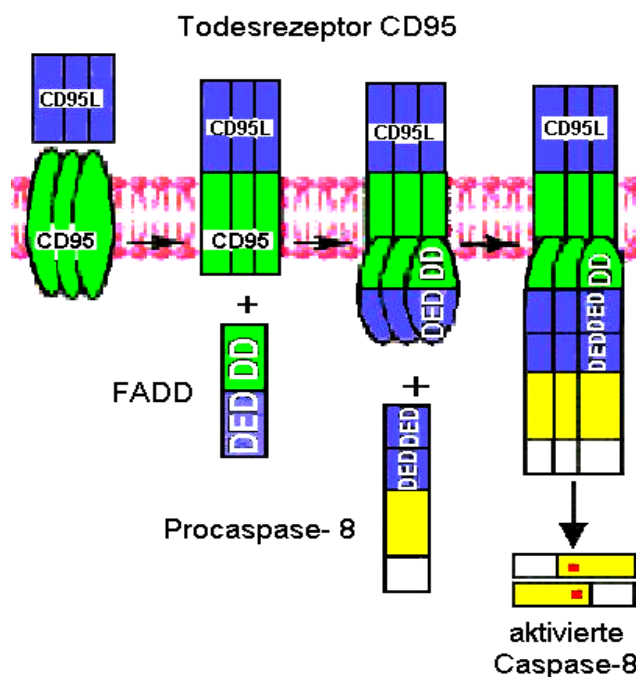


Abb. 4: Apoptoseinduktion über das CD95/CD95L-System. CD95L-Bindung an die CD95-Rezeptoren, Trimerisierung, Annäherung der Todesdomänen DD, Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD und Bindung der Procaspase-8 = DISC-Bildung. Wahrscheinlich durch räumliche Annäherung kommt es zur autokatalytischen Spaltung der Procaspase-8 in ihre aktive Untereinheit (nach Kaufmann et al., 2001<sup>39</sup>).

### 1.3.2 Mitochondrial vermittelte Apoptose

Im letzten Jahrzehnt klärte sich die Rolle der Mitochondrien in der Signaltransduktion der Apoptose deutlich. Viele Chemotherapeutika, UV-Strahlung, sowie Stress-induzierte Moleküle, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies kristallisierten sich als Auslöser für Apoptose über Mitochondrien heraus. Sie können unabhängig vom Todesrezeptor-Signalweg Apoptose induzieren.

#### 1.3.2.1 Bau und Funktion der Mitochondrien im Organismus

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einer Größe von ca. 1-5  $\mu\text{m}$ . Sie bestehen aus zwei Kompartimenten, klar getrennt durch zwei Membranen. Das Mitochondrieninnere, die Matrix, wird durch die innere Membran begrenzt, die stark gefaltet ist und sogenannte „Cristae“ bildet (Cristae-Typ, Sakuli-Typ). Der Intermembranraum ist durch die äußere Membran abgesetzt. An der inneren Membran findet die Atmungskettenphosphorylierung statt.

#### 1.3.2.2 Mitochondrien in der Mitochondrien-vermittelten Apoptose

Mitochondrien sorgen nicht nur für die Energiegewinnung, sondern sie tragen auch entscheidend zum apoptotischen Geschehen bei, denn sie enthalten Proteine, die nach Freisetzung in das Zytosol pro-apoptotisch wirken. Die genauen Vorgänge der Freisetzung dieser mitochondrialen Faktoren sind bis heute nicht eindeutig geklärt, jedoch existieren verschiedene Vorstellungen<sup>40-43</sup>.

Zwei Ereignisse sind in diesem Zusammenhang wichtig:

1. die Permeabilisierung der inneren mitochondrialen Membran, gekennzeichnet durch den Verlust des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\psi_m$ ) und durch Matrixschwellung und
2. die Bildung autonomer Kanäle durch pro-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2 Familie, z.B. Bax.

Beide Ereignisse führen im Endeffekt zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der äußeren Membran (im ersten Fall durch Ruptur, im zweiten Fall durch Kanalbildung) und so zur Freisetzung von Proteinen wie z.B. Cytochrom c. Dies ist für den weiteren apoptotischen Verlauf wichtig.

#### 1.3.2.2.1 Änderungen an der inneren mitochondrialen Membran

Unter physiologischen Bedingungen wird durch die Atmungskette ein elektrochemischer Gradient (Protonengradient) aufgebaut, das sog. mitochondriale Membranpotential (ca. -220 mV). Ein Verlust der Aufrechterhaltung der Protonenverteilung an der inneren Membran führt zu Veränderungen im Membranpotential. Die Zerstörung des elektrochemischen Gradienten führt zum (für die mitochondrienabhängige Apoptose) charakteristischen „Membranpotentialzusammenbruch“. Dies ist nachweisbar durch spezifische Fluoreszenzfarbstoffe wie JC-1.

Ein weiteres Charakteristikum ist die Permeabilitätsänderung (Permeability Transition, PT) der inneren Membran. Dahinter steht die Öffnung von sonst kontrollierten Kanälen (bestehend aus einem Komplex, gebildet durch den VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) und ANT (Adenin-Nucleotid Translocator) und weiterer Proteine, zusammengefasst zur „Permeability Transition Pore“ (PTP)) an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Membran<sup>43,44</sup>. Durch oxidativen Stress z.B. öffnet sich die PTP. Dies erlaubt die Passage von kleinen (< 1500 Da), löslichen Molekülen durch die innere Membran, was schließlich zur Schwellung der mitochondrialen Matrix führt. Schließlich bricht die äußere Membran auf und führt zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie z.B. Cytochrom c<sup>41</sup>.

#### 1.3.2.2.2 Änderungen an der äußeren mitochondrialen Membran

Newsome et al.<sup>45</sup> berichteten 1994 als erste von der essentiellen Bedeutung der Mitochondrien für die Apoptose und vom Eingreifen pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine.

Es stellte sich heraus, dass zytotoxische Substanzen und pro-apoptotische Bcl-2-Proteine zur Freisetzung von apoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c<sup>46</sup> oder AIF (Apoptosis-Inducing Factor)<sup>47</sup> aus den Mitochondrien führen. Dabei ist Cytochrom c eine zentrale Rolle im apoptotischen Geschehen zuzuweisen. Freigesetztes Cytochrom c bildet zusammen mit inaktiver Caspase-9 und weiteren Cofaktoren wie ATP und Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) einen Komplex, das sog. Apoptosom<sup>48</sup>. Im Apoptosom wird die inaktive Caspase-9 autokatalytisch gespalten. Diese aktiviert schließlich die Effektorcaspase-3 (s. Abb. 6). Ist Cytochrom c freigesetzt, so ist der „Point of no return“ erreicht. Das Todessignal kann nicht mehr zurückgenommen werden, und die Zelle stirbt.

Kinetische Studien an HeLa Zellen zeigten eine initiale und variable lag-Periode, nach der alles Cytochrom c aus allen Mitochondrien innerhalb kurzer Zeit freigesetzt wurde. Dieser „alles oder nichts-Effekt“ unterstreicht die Bedeutung dieses entscheidenden Schrittes <sup>49</sup>.

Ein Protein aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien vermag jedoch auch unabhängig von Caspasen das apoptotische Signal zu induzieren: AIF (Apoptosis-Inducing Factor, s.a. Abb. 6).

Wie kontrollieren Proteine der Bcl-2 Familie die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran? Zunächst ein Überblick über die Bcl-2 Familie.

### 1.3.2.3 Die Bcl-2 Familie

#### 1.3.2.3.1 Historisches und Einteilung

Die Bcl-2 Familie ist nach dem zuerst entdeckten Mitglied benannt. Das bcl-2 Gen fiel bei der chromosomalen Analyse des B-Zell-Lymphoms (B-cell lymphoma, daher der Name bcl) auf: es war transloziert <sup>50</sup>.

Die Proteinfamilie hat heute mehr als 12 Mitglieder. Diese unterteilt man in drei funktionelle Gruppen <sup>51,52</sup>. Mitglieder der ersten Gruppe, wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, sind durch 4 kurze konservierte Bcl-2 homologe (BH) Domänen charakterisiert (BH1-BH4). Sie besitzen einen C-terminalen hydrophoben Schwanz, welcher die Proteine an der äußeren mitochondrialen Membranoberfläche lokalisiert. Auf diese Weise kann der Hauptteil des Proteins ins Zytosol hineinragen. Mitglieder der Gruppe I besitzen alle anti-apoptotische Eigenschaften und können die Zellen vor dem apoptotischen Zelltod schützen. Gruppe II hingegen beinhaltet diejenigen mit pro-apoptotischen Eigenschaften wie Bax oder Bak. Sie besitzen eine ähnliche Gesamtstruktur wie Gruppe I (Sequenzhomologie in BH1, BH2 und BH3 aber nicht in BH4) <sup>20</sup>, sowie ebenfalls einen hydrophoben Schwanz. Gruppe III besteht aus einer Vielzahl verschiedener Proteine, deren Gemeinsamkeit in einer 12-16 Aminosäuren umfassenden BH3-Domäne besteht <sup>17</sup>. Ein Mitglied ist z.B. Bid. Bid ist ein Bindeglied zwischen CD95-Rezeptor-vermittelter und Mitochondrien-vermittelter Apoptose (s.a. Abb. 6). Interessanterweise haben pro-apoptotische Familienmitglieder eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem

porenformenden Diphtherie-Toxin. Dies lässt eine Funktion zur Kanalbildung in der äußeren mitochondrialen Membran vermuten <sup>53</sup>.



Abb. 5: Einteilung der Bcl-2 Familienmitglieder (Auswahl).

Beschreibung siehe Text. TM = Domäne, die als Membrananker fungiert. BH: Bcl-2 homologe Domäne.

#### 1.3.2.3.2 Funktion und Wirkung

Die Bcl-2 Familie wird unterteilt in pro-apoptotische Mitglieder, wie u.a. Bax, Bad (Gruppe II) oder Bid (Gruppe III), und anti-apoptotisch wirkende Mitglieder wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>. Lokalisierungsstudien ergaben, dass sich Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> an der äußeren mitochondrialen Membran befinden. Transfektions- und Knock-out-Experimente zeigten, Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> sind in der Lage die mitochondriale Membran zu stabilisieren und somit die Cytochrom c-Freisetzung zu hemmen <sup>54</sup>. Die pro-apoptotischen Proteine sind im Zytosol oder an der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert.

Die genauen Mechanismen der pro- bzw. anti-apoptotischen Wirkung der Bcl-2 Familienmitglieder werden in der Literatur noch diskutiert (s.a. Hengartner, 2000 <sup>17</sup>).

Bax und Bad scheinen die mitochondriale Membranpermeabilisierung durch eine Art Kanal- oder Porenbildung zu provozieren. Zytosolisches Bax transloziert zur mitochondrialen Membran und bildet dort kanalformende Di- oder Oligomere. Bad liegt phosphoryliert und somit inaktiv vor, wird aber während der Apoptose dephosphoryliert und wandert an die äußere mitochondriale Membran. Dort interagiert Bad mit anti-apoptotisch wirkendem Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> und inaktiviert diese durch Heterodimerbildung. Durch Porenöffnung oder durch eine fehlerhafte Kanalregulation entsteht die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, die für den Ablauf der Apoptose von Bedeutung ist (s. 1.3.2.2): Cytochrom c und andere mitochondriale Faktoren (AIF) werden frei- und die Caspasenkaskade in Gang gesetzt.



Bid, ein weiteres apoptotisch wirkendes Mitglied der Bcl-2 Familie, liegt im Zytosol frei vor und wird durch aktivierte Caspase-8 gespalten (s.o.), es entsteht t-Bid (truncated Bid). t-Bid transloziert zum Mitochondrium und verursacht an der äußeren Membran die mitochondriale Membranpermeabilisierung und dadurch wiederum die Freisetzung von weiteren pro-apoptotischen Proteinen wie Cytochrom c. Über Bid kommt es zur Verstärkung des CD95-Pathways in Typ II Zellen und zwar über die mitochondriale „Aktivierung“<sup>38</sup>.

Eine Inaktivierung von Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> in der Apoptose kann durch Phosphorylierung erfolgen. Diese kann über die Stress-induzierte Proteinkinase (SAPK, Stress-Activated Protein Kinase oder c-jun-Amino-terminal Kinase, JNK), eine Kinase aus der Familie der MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) erfolgen<sup>55,56</sup>.

Abb. 6 zeigt eine Zusammenfassung der Apoptoseinduktion in Typ I und II Zellen:

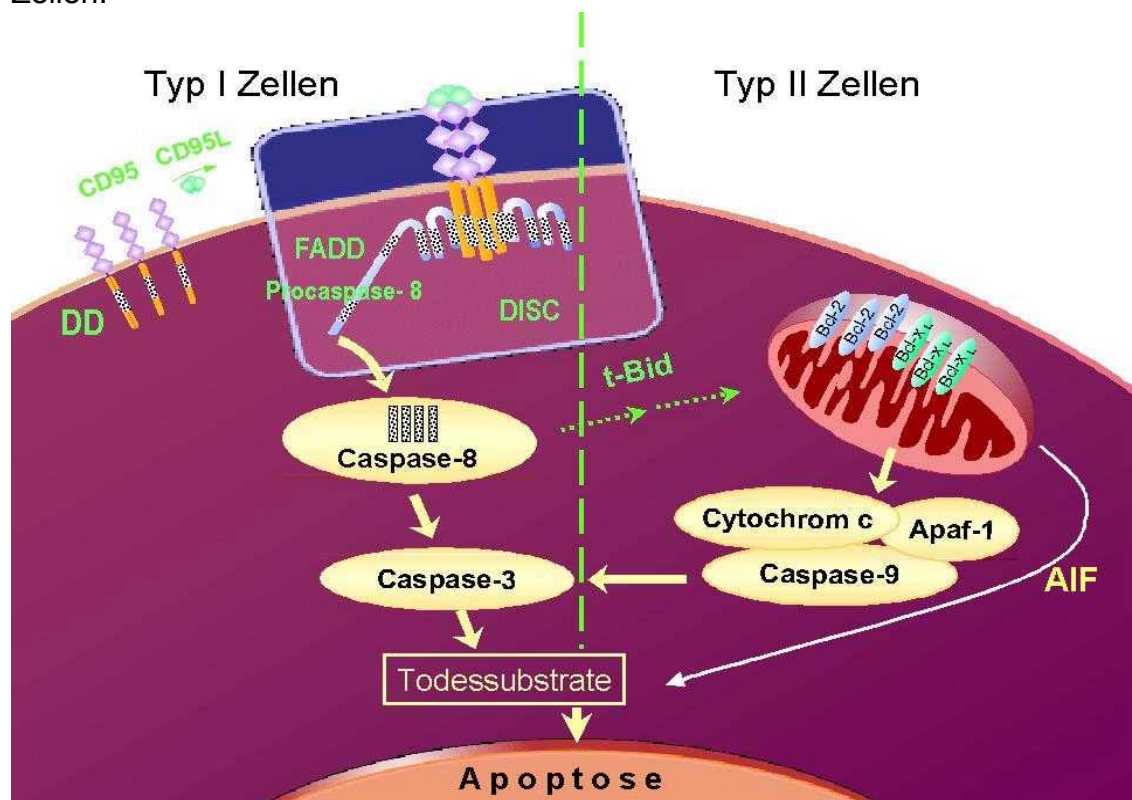


Abb. 6: Zusammenfassung Apoptoseinduktion in Typ I und Typ II Zellen. Genaue Erläuterung siehe Text. DD= Death Domain; CD95 = CD95-Rezeptor; CD95L= CD95-Ligand; FADD = Fas-Associated Death Domain; DISC = Death-Inducing Signaling Complex; Apaf-1 = Apoptosis protease activating factor-1; AIF = Apoptosis-Inducing Factor; t-Bid= truncated Bid.

## 1.4 Mediatoren der Signaltransduktion

Die Mechanismen, die zur Aktivierung der Mitochondrien und schließlich zur intrinsisch verlaufenden Apoptose führen, werden intensiv untersucht.

Verschiedene Stimuli, z.B. zytotoxische Substanzen, führen im Verlauf apoptotischer Vorgänge zu einer frühzeitigen Erhöhung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) <sup>57</sup>.

### 1.4.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Die Anwesenheit freier Radikale in biologischen Systemen wurde vor fast 50 Jahren entdeckt <sup>58</sup>. Bald darauf hypothesierten Harman et al. <sup>59</sup>, dass reaktive Sauerstoffradikale Nebenprodukte enzymatischer Reaktionen sind. 1956 machte er freie Radikale für zelluläre Schäden, Mutagenese, Krebs und für den degenerativen Prozess beim Altern verantwortlich <sup>60</sup>.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen z.B. das Superoxidationion, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und das Peroxynitritanion <sup>61</sup>. Studien charakterisierten die mitochondriale Elektronentransportkette <sup>62</sup> (respiratorischer Burst) und die NADPH Oxidase <sup>60</sup> (oxidativer Burst) als Hauptquellen der ROS. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts zeigen Studien immer klarer, dass der Organismus sich nicht nur an eine Koexistenz mit den schädlichen Radikalen adaptiert, sondern dass er auch Mechanismen zur vorteilhaften Nutzung freier Radikale entwickelt hat: Diese wären z.B. die Regulation des Gefäßtonus oder die Verstärkung von Signalen ausgehend von vielen Membranrezeptoren. Eine weitere wichtige Rolle spielen reaktive Sauerstoffspezies in der Vermittlung von Signalen der Zellkommunikation und in der Induktion oder Inhibierung der Zellproliferation. In der Apoptoseinduktion besitzen sie eine Schlüsselstellung <sup>61</sup>. Steigende ROS-Konzentrationen in den Zellen beeinflussen die Aktivität von signalvermittelnden Molekülen wie z.B. von Proteinkinasen und Phosphatasen <sup>63,64</sup>. Dies hat eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. NF-κB (nuklärer Faktor κB) oder AP-1 (Aktivator-Protein-1) zur Folge <sup>60,65,66</sup>. Setzt man z.B. T-Lymphozyten moderaten Konzentrationen von Wasserstoffperoxid aus, so fand man eine vom CD95-Rezeptor unabhängige Apoptoseinduktion, die abhängig von mitochondrialer ROS-Produktion und von der NF-κB-Aktivierung war <sup>67</sup>. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist u.a. an Differenzierungsprozessen beteiligt. Viele oxidative Stress-Stimuli, wie z.B.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-Licht,  $\gamma$ -Bestrahlung führen über unterschiedliche Mechanismen zur Aktivierung von AP-1<sup>60</sup>. Die Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors AP-1 basiert auf einer oxidativen Aktivierung der Jun-Kinase (JNK, s.a. 1.4.1.2). Diese, zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK, s. folgendes Kapitel) gehörende Kinase, phosphoryliert Serinreste (Ser 63 und 73) der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von c-Jun, eine Domäne, die für die Aktivierung von AP-1 benötigt wird<sup>68</sup>. Oxidativer Stress aktiviert die übergeordneten Signal-Kaskaden der MAPK. Die aktivierten MAPK führen schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

#### 1.4.1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

##### 1.4.1.2.1 Physiologische Bedeutung und Bedeutung in der Apoptose

Verschiedene Studien zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) in leukämischen Zelllinien induzieren<sup>69-72</sup>. Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden haben großen Anteil an der Signalweiterleitung in zellulären Programmen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod<sup>73-77</sup>.

Die Signalkaskade, die zur Aktivierung der MAPK führt, ist hierarchisch organisiert (Abb. 7). Nach Aktivierung von Oberflächenrezeptoren oder durch Stress-Stimuli kommt es über GTP-bindende Proteine, z.B. Rho oder Ras, zur Aktivierung der MAPKinase-Kinase-Kinasen (u.a. Raf, MEKK1/4, ASK1). Diese aktivieren ihre Substrate, die MAPKinase-Kinasen (MAPK-Kinasen) wie z.B. MEK1/2 und MKK3/6/4/7 durch Phosphorylierung an Serin/Threonin-Resten. Daraufhin werden die hierarchisch untergeordneten MAPKinasen (MAPK) wie ERK1/2, JNK oder p38 durch duale Phosphorylierung an ihrem Tripeptid-Motiv Thr-X-Tyr aktiviert (X = Glu für die ERK, Pro für die JNK und Gly für die p38 Kinase).

Aktivierte MAPK phosphorylieren daraufhin ihre jeweiligen Substrate, z.B. die Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun (welche den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 bilden, s. 1.4.1.1), was in der Folge Auswirkungen auf die Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod (Apoptose) hat.

Die Aktivierung der JNK (c-jun-N-terminale Kinase), auch SAPK (Stress-aktivierte Kinase) genannt, und der p38 wird v.a. durch zellulären Stress

ausgelöst, die Signalkette der ERK1/2-Aktivierung wird in erster Linie durch Wachstumsfaktoren induziert.

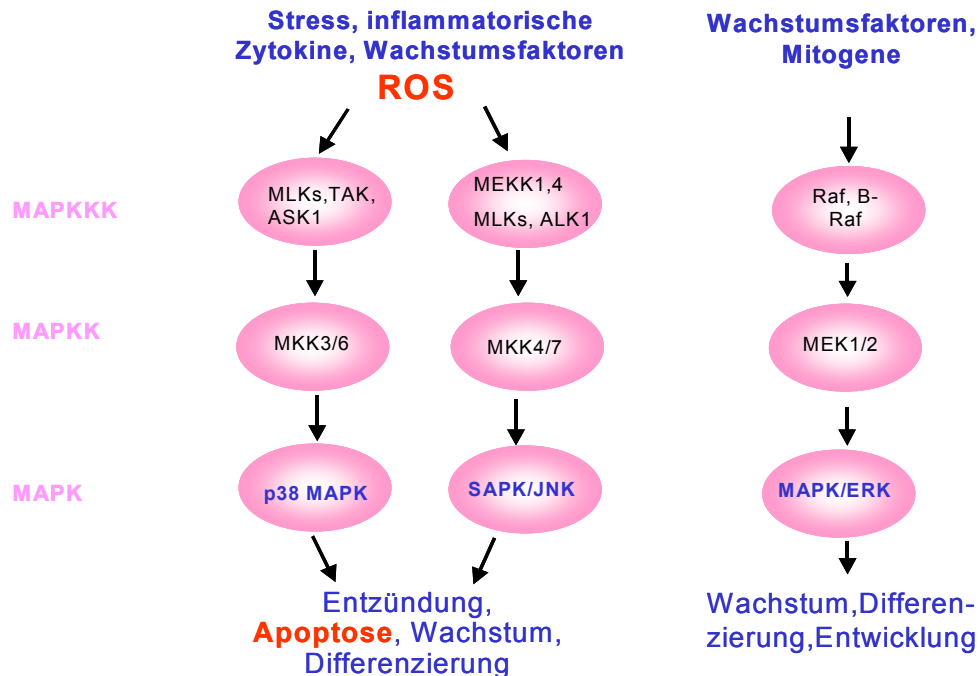


Abb. 7: Die MAPK-Kaskade.

## 1.5 Ajoen

### 1.5.1 Organoschwefelverbindungen im Knoblauch (*Allium sativum* L.)

Die intakte Knoblauch-Zwiebel (Knolle) enthält bis 1 % des Frischgewichtes Alliin (S-Allylcystein-S-oxid) (1). Gewebsverletzungen führen zur Freisetzung der Alliinase, ein Enzym, welches wahrscheinlich in Vakuolen gespeichert ist. Alliinase spaltet Alliin und als Hauptprodukt entsteht Allicin (Allyl-2-propenthiosulfonat) (2). Allicin ist instabil und wird in eine Reihe schwefelhaltiger Verbindungen transformiert. Abhängig von den Bedingungen während der Transformation bildet sich Ajoen (3) als Hauptkomponente<sup>4,78-80</sup>.

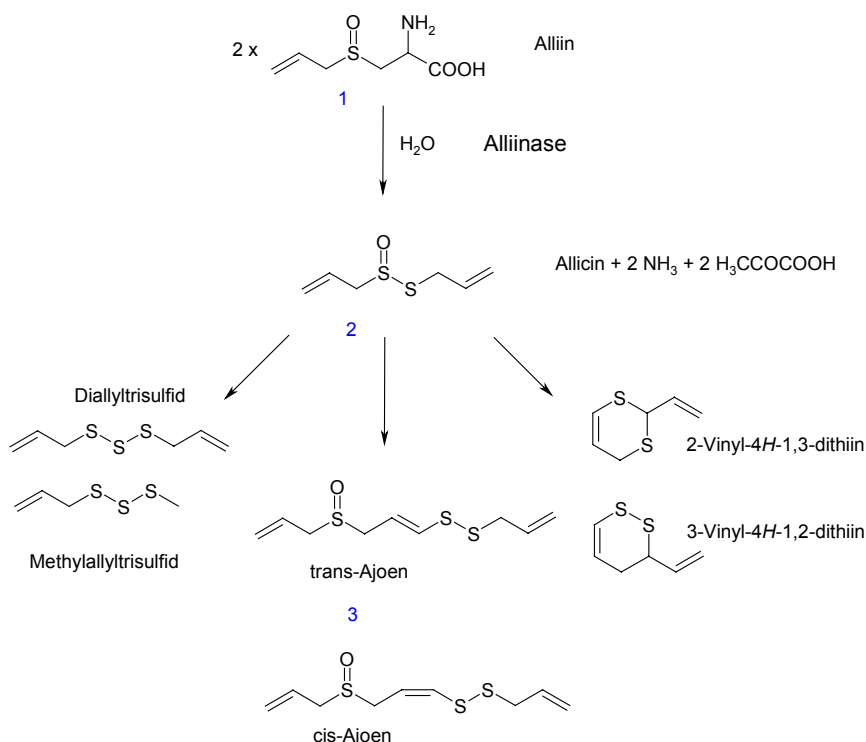


Abb. 8: Übersicht der Entstehung diverser Schwefel-enthaltender Verbindungen im Knoblauch nach Alliinase-Freisetzung (nach Prof. Dr. H. Wagner<sup>81</sup>).

Das in dieser Arbeit verwendete Ajoen (*E/Z*-Ajoen) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Wagner (GBF Braunschweig) synthetisiert. Die Synthese von Ajoen erfolgte aus Diallyldisulfid über die Zwischenstufe des Allicins mit anschließender chromatographischer Reinigung (HPLC). Die Reinheit erreichte mehr als 95 %<sup>82</sup>.

#### 1.5.1.1 Organoschwefelverbindungen aus *Allium sativum* L.- Stand der Forschung

Knoblauch und Knoblauchextrakte (*Allium sativum* L.) stehen seit alters her im Ruf gegen unterschiedliche Krankheiten wirksam zu sein. Ihre möglichen günstigen Wirkungen sind seit den 80er Jahren verstärkt Gegenstand moderner Forschung.

Biologische Wirkungen von Knoblauchinhaltsstoffen reichen von antimikrobiellen und antithrombotischen Eigenschaften bis hin zur Immunstimulation und zu antitumoralen Effekten<sup>83</sup>. Epidemiologische Studien in China und Italien zeigten ein verringertes Magenkrebsrisiko durch regelmäßigen Verzehr von Knoblauch und Knoblauchprodukten<sup>84-86</sup>. Im Tierversuch konnte ein Schutz vor chemisch-induzierten Tumoren durch Verabreichung von frischen oder wässrig-alkoholischen Extrakten aus

Knoblauch erreicht werden<sup>87-89</sup>. Einige Studien zeigten eine antiproliferative Wirkung von Thioallyl-Derivaten in mehreren Säugetiertumorzelllinien<sup>90-93</sup>. Berichte über Apoptoseinduktion durch einige OSV liegen vor<sup>94,95</sup>.

Die molekularen Mechanismen, die diesen antimutagenen und antitumorigenen Eigenschaften von Knoblauch und seinen Inhaltsstoffen zugrunde liegen sind noch nicht genau bekannt.

<b>Antineoplastische Wirkung einiger Organoschwefelverbindungen</b>	
<b>Schwefelverbindung</b>	<b>Zelltyp</b>
Ajoen	Lymphozyten, Kolon-, Leukämiezellen
Alicin	lymphoide Tumorzellen
Diallylsulfid	Prostatazellen, Leukozyten
Diallyldisulfid	Lungen-, Kolon-, Haut-, Prostata-, Brustdrüsenzellen
Diallyltrisulfid	Lungenzellen
S-Allylcystein	Neuroblastom, Melanom
S-Allylmercaptocystein	Prostata-, Brustdrüsenzellen

*Tabelle 2: Zusammenstellung der antineoplastischen/antitumoralen Wirkung einiger Organoschwefelverbindungen<sup>96</sup>.*

Die meisten Studien über Organoschwefelverbindungen aus Knoblauch, Zwiebeln oder Broccoli befassen sich mit deren chemopräventiver Wirkung, die der Entwicklung von Darm-, Speiseröhren- und Lungenkrebs entgegenwirkt. Wong et al.<sup>97</sup> versuchten über neue synthetische Organoschwefelverbindungen, die Apoptose in leukämischen Zellen zu induzieren und eine Struktur-Wirkungsbeziehung herzustellen. Dabei fanden sie

- a) den Disulfidrest für die Signalauslösung als bedeutsam und
- b) den Einfluss benachbarter Gruppen auf die Stärke der Todesinduktion in den Zellen.

Dabei besaßen Verbindungen wie (1) oder (2) keinen Effekt auf Leukämiezellen (akut-myeloische Leukämiezellen, AML-3, KK, WI38) im MTT-Test. Verbindungen wie (3) und (4) waren dagegen gegen AML Zellen hochaktiv (Abb. 9).

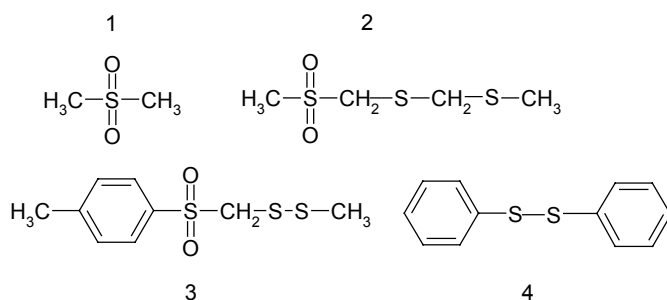


Abb. 9: Struktur der nichtwirksamen (1 und 2) und hochwirksamen (3 und 4) OSV auf Leukämiezellen (nach Wong et al., 2000<sup>97</sup>).

### 1.5.1.2 Ajoen

Scharfenberg et al.<sup>4</sup> beschrieben 1990 eine zytotoxische Wirkung von Ajoen. Dabei erwies sich Ajoen an 3 Zelllinien als toxisch, wobei die tumorale Zelllinie BJA-B (Burkitt Lymphoma) sich als am empfindlichsten zeigte.

Desweiteren stellte man fest, dass Ajoen die Plättchenaggregation durch spezifische Einflussnahme auf die Rezeptoroberfläche hemmt. Als primärer Angriffspunkt von Ajoen nimmt man das Signaltransduktionssystem (G-Proteine) in der Plättchenplasmamembran an. Außerdem gilt die Hemmung der Proteinkinase C in Blutplättchen durch Ajoen als nachgewiesen<sup>98</sup>. Ferner wurde eine antagonisierende Wirkung auf Integrin-abhängige Prozesse in HIV-infizierten Lymphozyten und anderen Zellsystemen durch Ajoen gezeigt<sup>99</sup>.

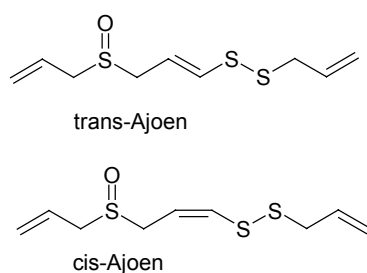


Abb. 10: Strukturformel von Ajoen.

Romano et al.<sup>100</sup> wiesen die membranverändernden Effekte von Ajoen in Immunzellen nach: Ajoen verhinderte u.a. das „Capping“ des Antigen-Rezeptors in B-Lymphozyten und unterband die Mitogen-stimulierte Lymphozytenproliferation durch PHA (Phytohämagglutinin A) oder PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zelllinien

Die humane akut-myeloische Zelllinie HL-60 (DSM ACC3, DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Deutschland), und die leukämische T-Zelllinie Jurkat (Klon J16) sowie CD95-resistente Jurkat<sup>R</sup> Zellen (beide freundlicherweise von Dr. P. H. Krammer und Dr. H. Walczak zur Verfügung gestellt <sup>101</sup>) wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI-Medium 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 2 mM L-Glutamin (Life Technologies, Eggenstein, Germany) kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert.

Mit pSFFV-neo (HL-60/neo) oder mit pSFFVneo-bcl-x<sub>L</sub> (HL-60/bcl-x<sub>L</sub>) Plasmid transfizierte HL-60 Zellen wurden uns von Dr. K. N. Bhalla (Moffitt Cancer Center and Research Institute, University of South Florida, Tampa) zur Verfügung gestellt <sup>102</sup>. Transfizierte HL-60 Zellen wurden wie oben beschrieben, aber unter Zusatz von 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren (NEM, Invitrogen, Life Technologies) und 1 mM Natriumpyruvat (NP) kultiviert. Weiterhin erfolgte bei jeder fünften Passage die Zugabe des Selektionsantibiotikums G418 (Geneticinsulfat 418, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland).

HL-60 Zellen, die konstitutiv eine nicht aktivierbare Form der JNK (dominant-negativ) exprimieren (HL-60/DN-JNK <sup>103</sup>), wurden wie HL-60 Zellen kultiviert, jedoch in Anwesenheit von 100 Units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml G418.

Jurkat Zellen, die mit dem Kontroll-(neo) oder bcl-x<sub>L</sub> Vektor <sup>104,105</sup> transfiziert waren, wurden in RPMI-Medium 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10 % FKS und 1 mg/ml G418 gezogen.

Zellen, die direkt G418-exponiert waren, wurden nicht für Experimente verwendet.



Übersicht der verwendeten Suspensionszelllinien und der Zusätze			
Zellen	Medium	Zusätze	Antibiotika
HL-60	RPMI 1640 (PAN)	10 % FKS Gold (PAN)	keine
HL-60/neo HL-60/bcl-x <sub>L</sub>	RPMI 1640 (PAN)	10 % FKS (Life Technologies), 0,1 mM NEM, 1 mM NP	Jede 5te Passage Geneticinsulfat (G418), 0,8 mg/ml
HL-60/DN-JNK	RPMI 1640 (PAN)	10 % FKS Gold (PAN)	Penicillin G 100 U, 100 µg/ml Streptomycin, G418 100 µg/ml
Jurkat	RPMI 1640 (PAN)	10 % FKS Gold (PAN)	keine
Jurkat <sup>R</sup>	RPMI 1640 (PAN)	10 % FKS Gold (PAN)	keine
Jurkat/neo Jurkat/bcl-x <sub>L</sub>	RPMI 1640 (PAN)	10 % FKS Gold (PAN)	Jede 5te Passage G418 (0,8 mg/ml)

Abk.: FKS = fötales Kälberserum, NP = Natriumpyrophosphat, NEM = Nichtessentielle Aminosäuren.

*Tabelle 3: Verwendete Suspensionszelllinien und Zusätze.*

## 2.1.2 Zellkulturtechniken

### 2.1.2.1 Einfrieren von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff (-196°C) zur längeren Aufbewahrung eingefroren werden. Hierfür wird ein spezielles Einfriermedium verwendet, das zur Verhinderung der Ruptur von Zellen 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält. Das Einfriermedium wurde nach Herstellung sterilfiltriert.

Zusammensetzung:

10 % DMSO
20 % FKS
Medium (Arbeitsmedium)

Die Zellen wurden zentrifugiert (360xg), der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde mit 4°C kaltem Einfriermedium versetzt, und die Zellen mit einer sterilen Pipette (10 ml Messpipette) vorsichtig auf Eis suspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Suspension in vorgekühlte Kryoröhrchen. Die Röhrchen wurden sofort auf Eis gestellt. Zunächst wurden die Zellen für einige Tage bei -85°C eingefroren, bevor sie schließlich in den Stickstofftank überführt wurden.

### 2.1.2.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen, bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (360xg) und in frischem Medium aufgenommen. Dadurch entfernte man sowohl tote Zellen als auch ausgetretenen Zellinhalt und noch restliches DMSO (aus dem Einfriermedium).

### 2.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussäen von Suspensionszellen

Dazu wurden die Zellen (Dichte etwa  $1,5-2 \times 10^6$  Zellen/ml) bei 360xg abzentrifugiert, das Pellet in ca. 10 ml frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Etwa 200 µl der Suspension wurden in ein Eppendorff-Zentrifugencap überführt und die Zellzahl mit einem Coulter Counter (Coulter, Krefeld) bestimmt. Die benötigte Zellzahl wurde durch entsprechende Verdünnung mit Medium eingestellt.

## 2.1.3 Zellinkubation

### 2.1.3.1 Substanzen

Die Zellen wurden mit folgenden Substanzen in den Zellkulturexperimenten (vor-) inkubiert:

Ajoen	(E,Z)-4,5,9-Trithiadodeca-1,6,11-trien-9-oxid (Prof. Dr. K. G. Wagner, GBF, Braunschweig), in Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) suspendiert
Etoposid	Calbiochem, Bad Soden; in DMSO gelöst
N-Acetylcystein	Sigma, Deisenhofen; in PBS gelöst, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
z-VAD-fmk	Breitbandcaspaseinhibitor; Calbiochem, Bad Soden
z-IETD-fmk	Caspase-8 Inhibitor; Calbiochem, Bad Soden
Bongrekic-Säure	Calbiochem, Bad Soden
Rotenon	Sigma, Deisenhofen
PD 98059	Calbiochem, Bad Soden
U 0126	Calbiochem, Bad Soden
SB 203580	Calbiochem, Bad Soden
Wortmannin	Alexis Biochemicals, Grünberg
CD95-Rezeptor-Antikörper	Anti-Fas (ZB4, monoklonaler Antikörper IgG <sub>1</sub> ) MoBiTec, Göttingen
FITC-konjugierter Zweit-Antikörper	Rat Anti-Mouse; PharMingen, Becton Dickinson
Isotypenkontrolle	FITC-Mouse-IgG <sub>1</sub> ; PharMingen, Becton Dickinson
CD95L	CD95-Ligand (Fas-Ligand, löslich, human rekombinant) Alexis, Grünberg

*Tabelle 4: Zur (Vor-) Inkubation verwendete Substanzen.*

#### Färbemittel

Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid, Molecular Probes
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma
DHR-123	Dihydrorhodamin, Molecular Probes, MoBiTec
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma

*Tabelle 5: Färbemittel.*

### 2.1.3.2 Photometrische Bestimmung der Vitalität der Zellen (MTT-Assay)

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Zelltodinduktion von der eingesetzten Ajoen-Konzentration mittels MTT-Test bestimmt bzw. der MTT-Test wurde zur Bestimmung der IC<sub>50</sub> des Ajoens eingesetzt.

*Prinzip:* Ein Parameter für die Vitalität von Zellen ist ihre mitochondriale Atmungsaktivität. Die je nach Vitalität der Zellen im unterschiedlichen Ausmaß stattfindende Reduktion von zugesetztem MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in blaues Formazan kann photometrisch

bestimmt werden und als Maß für die mitochondriale Atmungsaktivität/Vitalität genommen werden: je vitaler die Zellen, desto mehr blaues Formazan wird gebildet<sup>106</sup>.

Weiterhin erfolgte der Einsatz des MTT-Tests, um einen möglichen unspezifischen toxischen Effekt aller anderen (außer Ajoen, Etoposid) eingesetzten Substanzen/Hemmsubstanzen auszuschließen, was jedoch nicht weiter explizit erwähnt wurde.

*Durchführung:*

MTT-Lösung: 5 mg MTT wurden in 1 ml PBS gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C in Aliquots gelagert.

100 µl Zellsuspension (Dichte  $9 \times 10^5$  Zellen/ml) wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden mit Ajoen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurde MTT (Endkonzentration 0,5 mg/ml) dazugegeben und für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieser Zeit setzten die Zellen das Tetrazoliumsalz in unterschiedlichem Maße, je nach mitochondrialer Atmungsaktivität, in das unlösliche blaue Formazan um. Durch Zusatz von 200 µl DMSO (für 2 h, Lichtausschluss) wurden die gebildeten Formazankristalle unter Lyse der Zellen gelöst. Anschließend wurde die Absorption bei 550 nm in einem ELISA Reader (Typ: SLT Spectra, SLT Labinstrumente, Crailsheim) vermessen und statistisch ausgewertet.

## **2.2 Durchflusszytometrie**

### **2.2.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine vielseitige Methode zur Analyse von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von einzelnen Zellen in Suspension. Mit dieser Methode kann z.B. die Expression von Membranoberflächenproteinen mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper quantitativ analysiert werden. Ebenso ist eine morphologische Charakterisierung der Zellen nach ihren Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Eigenschaften möglich (s.a. Ergebnisse 3.1.1.2). Nach Permeabilisierung und Färbung der DNA mit Fluorochromen, wie z.B. Propidiumjodid, kann der DNA-Gehalt von Zellen erfasst werden (s. Ergebnisse 3.1.1.3.2).

## 2.2.2 Anwendungen der Durchflusszytometrie

### 2.2.2.1 Charakterisierung von Form und Größe der Zellen

*Prinzip:* Im Durchflusszytometer werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Dabei wird das Laserlicht entsprechend der Zellgröße und der Granularität der Zellen gestreut und von Detektoren aufgefangen (s. Abb. 11).

Die Zellgrößenänderung wirkt sich im Vorwärtstreulicht (FSC= forward scatter) aus, die Veränderung in der Granularität im Seitwärtstreulicht (SSC= side scatter).

Im Verlauf der Apoptose schrumpfen die Zellen und ihre Struktur wird granulierter. In der FSC/SSC Darstellung (sog. „Dot Plot“) kann man die Entstehung einer zweiten „Zellwolke“ erkennen, ein Bild, das durch die veränderten Vorwärts- und Seitwärtstreulichteigenschaften der apoptotischen Zellen hervorgerufen wird: je mehr die Zellen schrumpfen, desto kleiner wird das Signal im Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC), je granulierter ihre Gesamtstruktur ist, desto größer ist das Signal im Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC) <sup>107</sup>. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels CELLQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg).

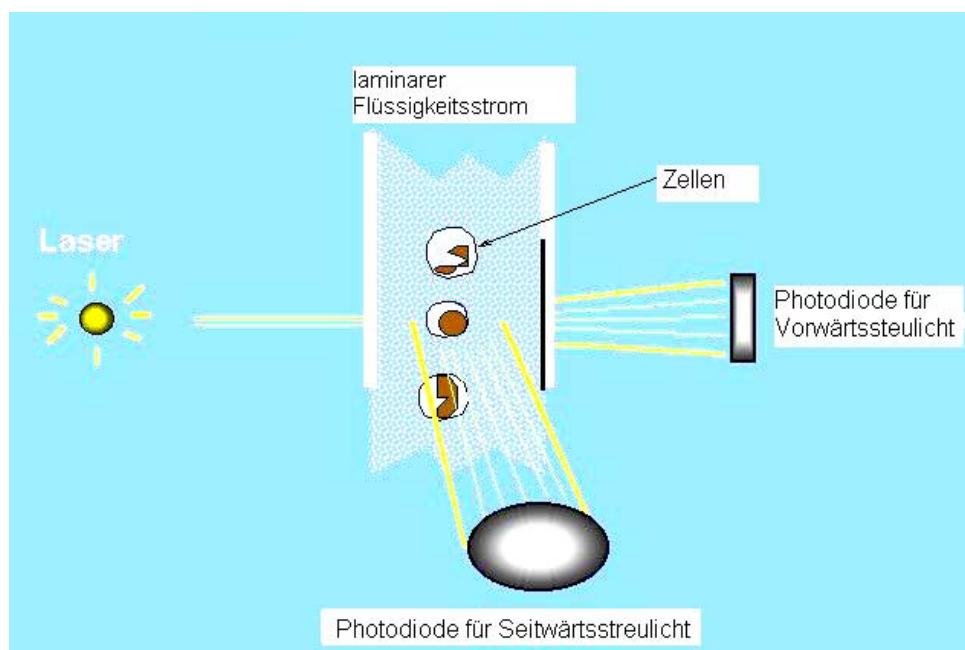


Abb. 11: Funktion des Durchflusszytometers (schematisch) zur Bestimmung der Form und Größe der Zellen.

*Durchführung:*

Zellen werden mit Ajoen (20  $\mu$ M) für die im jeweiligen Experiment angegebenen Zeitspannen inkubiert, durch Zentrifugation (360xg) geerntet, einmal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in PBS-Puffer aufgenommen und im FACS (FACScalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter) vermessen.

#### 2.2.2.2 Messung der Zytotoxizität über den „Propidiumjodid-Ausschluss-Assay“

Eine Methode zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen ist die Färbung apoptotischer/toter Zellen mit Propidiumjodid. Die intakte Membran lebender Zellen verhindert das Eindringen von Farbstoffen wie Propidiumjodid, während in apoptotischen Zellen die Membranintegrität gerstört ist und so die Membran für Propidiumjodid durchlässig ist<sup>108</sup>. Propidiumjodid interkaliert in die DNA dieser Zellen und färbt sie an. So können nicht fluoreszierende, intakte Zellen leicht am FACS von fluoreszierenden, toten Zellen unterschieden und quantifiziert werden (Anregungswellenlänge 488 nm (Laser), Detektion: 530 nm, Fluoreszenzkanal 1 (FL-1)).

*Lösungen:*

50  $\mu$ g/ml Propidiumjodid in PBS-Puffer, ist unter Lichtausschluss herzustellen.

*Durchführung:*

Die Zellen werden mit Testsubstanz über einen angemessenen Zeitraum (z.B. 0-8 h) inkubiert, durch Zentrifugation geerntet (360xg), mit PBS gewaschen, mit PBS/Propidiumjodid-Lösung im Dunkeln versetzt, durchmischt (vortexen), und nach 5 min im FACS vermessen.

#### 2.2.2.3 Quantifizierung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Während des Zellzykluses durchlaufen die Zellen verschiedene Phasen mit unterschiedlichen DNA-Gehalten: in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase besitzen die Zellen einen einfachen, diploiden (2n) Chromosomensatz (46 Chromosomen). In der Synthesephase (S-Phase) wird DNA neu synthetisiert. Der DNA-Gehalt der Zelle steigt bis 4n an, dem Chromosomensatz, wie er schließlich am Ende der G<sub>2</sub>-Phase bzw. in der Mitosephase (92 Chromosomen, 4n) vorliegt.

Dieser Gegebenheit bedient man sich in der Durchflusszytometrie: Färbt man die DNA mit interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie Propidiumjodid (PI) an, so kann man die verschiedenen Zellzyklusstadien am FACS erfassen. PI lagert sich in die helikale Struktur der DNA ein (Interkalation) und wird durch den Laserstrahl des Zytometers zum Fluoreszieren gebracht. Je höher der DNA-Gehalt der Zelle, desto mehr Propidiumjodid interkaliert, und umso stärker ist die Fluoreszenz, die das Gerät quantitativ erfasst. Apoptotische Zellen besitzen einen Kern mit einem DNA-Gehalt der infolge DNA-Fragmentation kleiner als  $2n$  ist (sub-diploider DNA-Gehalt). Diese Kerne erscheinen bei der DNA-Gehaltsbestimmung unterhalb des  $G_0/G_1$ -Peaks (sub- $G_1$ -Bereich). Dieser Bereich kann mittels FACS gut quantifiziert werden (= Quantifizierung der Apoptoserate) (s.a. Ergebnisse, Abb. 18).

Die *Durchführung* erfolgte auf Eis: Für die Bestimmung der Apoptoserate mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden Zellen (HL-60, HL-60/neo, HL-60/bcl-x<sub>L</sub>, Jurkat, Jurkat<sup>R</sup>, Jurkat/neo, Jurkat/bcl-x<sub>L</sub>, HL-60/DN-JNK) mit Ajoen (20 µM) für die im Experiment (s.a. Tabelle 6) angegebenen Zeitintervalle inkubiert, dann mit PBS Puffer einmal gewaschen und mit PBS-Puffer, der zusätzlich 0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton-X-100 und 50 µg/ml Propidiumjodid enthielt, versetzt. Es wurde gemischt (vortexen) und die Zellen für 12 Stunden bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Vermessung: Zellen links vom  $G_0/G_1$ -Peak (s.a. Ergebnisse Abb. 18) gelten definitionsgemäß als apoptotisch (quantitative Auswertung mittels CELLQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg)).

In Tabelle 6 sind die Versuche zur Quantifizierung der Apoptoserate aufgelistet (Versuchsüberschrift; Zelltyp; vorinkubierte Substanz mit Vorinkubationszeit, falls eine Vorinkubation stattfand; (nachfolgender) Stimulus mit Konzentration und Zeit):

<b>Bestimmungen der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie</b>				
Nachweis	Zelltyp	Vorinkubation	Vorinkubationszeit	Stimulation
Detektion von Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt (Kapitel 3.1.1.3.3.)	HL-60	-	-	Ajoen (20 µM), 6 h
Zeitabhängige Induktion der Apoptose durch Ajoen (Kapitel 3.1.2)	HL-60	-	-	Ajoen (20 µM), 0-24 h
Abhängigkeit von Caspasen (Kapitel 3.2.1.3.)	HL-60	z-VAD-fmk	1 h	Ajoen (20 µM), 8 h
Induktion der Apoptose durch CD95L (Kapitel 3.2.2.2)	HL-60	-	-	CD95L (330 ng/ml) 6 bzw. 24 h
Einfluss von Ajoen auf die CD95-Rezeptorfunktion (Kapitel 3.2.2.2.2)	HL-60	Ajoen (20 µM)	1 h	CD95L (330 ng/ml), 6 bzw. 24 h
Apoptoseinduktion an CD95-resistenten Jurkat (Jurkat <sup>R</sup> )	Jurkat <sup>R</sup>	-	-	Ajoen (20 µM), 21 h
Bedeutung der Caspase-8 für die Ajoen-induzierte Apoptose (Kapitel 3.2.2.3)	Jurkat	z-IETD-fmk (10-40 µM)	1 h	CD95L (100 ng/ml)
	HL-60	z-IETD-fmk (10, 50 µM)	1 h	Ajoen (20 µM)
Mitochondrien-kontrollierter Pathway (Kapitel 3.2.3.4)	HL-60/neo HL-60/bcl-x <sub>L</sub> Jurkat/neo Jurkat/bcl-x <sub>L</sub>	-	-	Ajoen (0-40 µM) 8 bzw. 24 h
Notwendigkeit der Ajoen-induzierten JNK-Aktivierung für die Apoptose (Kapitel 3.2.4.2.3)	HL-60	SB 203580 (100 µM)	1 h	Ajoen (20 µM), 6 h
	HL-60/DN-JNK	-	-	Ajoen (20 µM), 0-24 h
Bedeutung der p38 MAPK (Kapitel 3.2.4.2.4)	HL-60	SB 203580 (0,5-2 µM)	1 h	Ajoen (20 µM), 6 h
Rolle der ERK1/2 (Kapitel 3.2.4.2.5.)	HL-60	U 0126 (1, 10 µM) PD 98059 (1, 10 µM)	1 h	Ajoen (20 µM), 6 h
Bedeutung der Akt (Kapitel 3.2.4.3.2)	HL-60	Wortmannin (50-200 nM)	1 h	Ajoen (20 µM), 6 h

*Tabelle 6: Bestimmungen der Apoptoserate nach Nicoletti et al., 1991<sup>109</sup>.*

#### 2.2.2.4 Bestimmung der CD95-Rezeptorexpression

Oberflächenantigene können mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels sekundärer, fluoreszenz-konjugierter (z.B. FITC) Antikörper im Laserlicht des Durchflusszytometers detektiert werden. Je mehr Antigen vorliegt, umso mehr Antikörper binden und umso stärker ist die Fluoreszenz, die vom Detektor



aufgefangen wird. In der Histogrammdarstellung (Fluoreszenzintensität gegen Zahl der gezählten Ereignisse) erfolgt die Auswertung über CELLQuest Software (Becton Dickinson).

*Durchführung:*

HL-60 Zellen wurden in 24-Well Platten mit der Dichte  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät, 1 Stunde ruhen gelassen (zur Adaption), durch Zentrifugation geerntet, einmal mit PBS gewaschen und mit Anti-CD95 Antikörper (Klon ZB4, 1  $\mu\text{g/ml}$ , MBL, Nagoya, Japan) bei  $4^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS/1 %FKS gewaschen und bei  $4^\circ\text{C}$  für 30 min mit einem zweiten Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Anti-Mouse IgG<sub>1</sub>-Antikörper (1  $\mu\text{g/ml}$ , Ratte, Pharmingen, Becton Dickinson, Heidelberg) inkubiert. Vor der Vermessung im Zytometer wurden die Zellen zweimal mit PBS/1 %FKS gewaschen.

Die Einstellung des Durchflusszytometers erfolgte mittels einer Isotypen-Kontrolle (20  $\mu\text{l}/10^6$  Zellen, Mouse-IgG<sub>1</sub>, FITC-markiert, 528 nm Filter FL-1).

Um in jedem Fall eine unspezifische Bindung des zweiten, FITC-markierten Antikörpers v.a. durch die veränderte Oberflächenstruktur nach Stimulation mit Ajoen auszuschließen, die einen falsch-positiven Befund erzeugen könnte, wurde folgendermaßen vorgegangen:

HL-60 Zellen wurden ausgesät, mit Ajoen inkubiert, nach den im Versuch angegebenen Zeiten geerntet, gewaschen und der Ansatz geteilt. Ein Teil wurde mit CD95-spezifischem Antikörper (Klon ZB4, 1  $\mu\text{g/ml}$ , MBL, Nagoya, Japan) inkubiert, der zweite Teil blieb ohne ersten Antikörper. Nach erfolgter Inkubation (30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde zweimal mit PBS/1 %FKS gewaschen. Anschließend pipettierte man den zweiten, FITC-markierten Antikörper (1  $\mu\text{g/ml}$  Anti-Mouse IgG<sub>1</sub>-Antikörper (Ratte) (Pharmingen, Becton Dickinson, Heidelberg) zu beiden Ansätzen hinzu, inkubierte weiter wie oben, und wusch die Zellen. Dann erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (s.o.).

#### 2.2.2.5 Messung des Membranpotentials der Mitochondrien mittels FACS

*Prinzip:* Lipophile Kationen akkumulieren in der mitochondrialen Matrix, verursacht durch den elektrochemischen Gradienten. Das mitochondriale Membranpotential liegt gewöhnlich zwischen  $-170\text{ mV}$  bis  $-220\text{ mV}$ . JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid), ein



Dihydrorhodamin-123 reagiert mit Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in Anwesenheit von Peroxidase, Cytochrom c oder  $\text{Fe}^{2+}$  zu oxidiertem, fluoreszierendem Rhodamin-123, welches im FACS nach Laseranregung detektiert werden kann (FL-1, 530 nm).

DHR-123 Stocklösung: 43 mM in Dimethylformamid.

Verwendeter Puffer:

HEPES (Natriumsalz)	5 mM
NaCl	0,15 M
pH	7,4

Die benötigte Zellzahl (HL-60 bzw. HL-60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub>) wurde in 1 ml HEPES-Puffer suspendiert und 15 min mit DHR-123 (Endkonzentration 0,4 mM) bei 37°C unter Lichtausschluss beladen. Danach wurde überschüssiger Farbstoff mit HEPES-Puffer durch Zentrifugation abgewaschen, und das Zellpellet in HEPES-Puffer aufgenommen und auf FACS-Röhrchen (Polypropylen-Tubes, Greiner Labortechnik, Deutschland) verteilt. Die FACS-Röhrchen mit Zellen wurden bei 37°C in einem Wasserbad ( $37^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ\text{C}$ ) bis zur Messung weiterinkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit Ajoen (20 µM) stimuliert und die Peroxidentstehung durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Einstellung der Eigenfluoreszenz der Zellen, benötigte man eine Kontrollmessung mit unstimulierten und ungefärbten Zellen. Zur Einstellung des „Grundzustandes“, wurden Zellen verwendet, die mit Farbstoff behandelt, aber nicht stimuliert wurden. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde mit CELLQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet.

Tabelle 7 zeigt eine Auflistung aller Experimente zur Untersuchung der ROS-Generierung (Kapitel in Ergebnisteil; Zelltyp; vorinkubierte Substanzen (Konzentration, Zeit); Stimulation mit Ajoen (Konzentration, Zeit)).

Experimente zur ROS-Generierung am FACS			
Kapitel	Zelltyp	Vorinkubation	Stimulation
Ajoen induziert zeitabhängig die Bildung von ROS (3.2.4.1.1)	HL-60	-	Ajoen (20 $\mu$ M), 0-60 min
ROS-Bildung ist konzentrationsabhängig (3.2.4.1.2)	HL-60	-	Ajoen (0-20 $\mu$ M), 15 min
ROS als wichtiger Mediator in der Ajoen-induzierten Apoptose (3.2.4.1.3)	HL-60	NAC (Sigma, 15 mM), 3 h	Ajoen (10 $\mu$ M), 20 min
Lokalisation der ROS-Entstehung (3.2.4.1.4)	HL-60	Rotenon (5 $\mu$ M, Sigma) 1 h, Bongkreik-Säure (50 $\mu$ M, Calbiochem), 1 h	Ajoen (20 $\mu$ M), 0-60 min
	HL-60/neo	-	Ajoen (20 $\mu$ M), 0-120 min
	HL-60/bcl-x <sub>L</sub>	-	

Tabelle 7: Experimente zur ROS-Generierung am FACS.

## 2.3 Mikroskopie

### 2.3.1 Lichtmikroskopie

Die Detektion der typischen, sichtbaren morphologischen Veränderungen in der Ajoen-induzierten Apoptose erfolgte mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen (inverses Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Axiovert 25) mit angeschlossener Spiegelreflexkamera (Canon)).

#### *Durchführung:*

HL-60 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden in 24-Well Mikrotiterplatten ausgesät, mit Ajoen (20  $\mu$ M) stimuliert und bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die fotografischen Aufnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeiten (0-24 h).

## 2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.3.2.1 Detektion des kondensierten Chromatins mittels Fluoreszenzmikroskopie

Ein wesentliches morphologisches Charakteristikum ist, neben der Schrumpfung der Zellen und der Abschnürung der apoptotischen Körperchen, das Auftreten der sog. DNA-Kondensation<sup>7</sup>.

Das Chromatin der Zellen verdichtet sich und erweckt den Eindruck zu „verklumpen“. Dies kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff interkaliert in die DNA. Dort, wo das Chromatin kondensiert, also verdichtet vorliegt, konzentriert sich auch der Farbstoff. Nicht-apoptotische Zellen nehmen den Farbstoff ebenfalls, jedoch wesentlich langsamer auf. Ihr Chromatin ist im Zellkern locker verteilt, deshalb detektiert man nur eine fahlblaue, sehr gleichmäßige Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop<sup>116</sup>.

#### *Durchführung:*

HL-60 Zellen wurden in der Dichte  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und für 0-24 h mit Ajoen (20  $\mu$ M) behandelt. Dann wurden die Zellen mit PBS einmal gewaschen, in PBS aufgenommen, in eine 24-Well Platte überführt, mit DAPI (Endkonzentration: 1  $\mu$ g/ml) versetzt und 10 min bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Analyse der kondensierten Chromatins erfolgte im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 25) mit angeschlossener Kamera, bei der Anregungswellenlänge 365 nm und unter Verwendung eines 420 nm Filters (Filter 02).

### 2.3.2.2 Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie

Hierfür wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.2.2.5 beschrieben behandelt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Bilder wurden auf einem CLSM 510 Mikroskop mit LSM 510 Software von Zeiss (Jena) freundlicherweise von T. Meindl an der GSF (Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg, München) aufgenommen.

### 2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Fixierung der Proben und die Aufnahmen der TEM zu den intrazellulären morphologischen Veränderungen in HL-60/neo im Vergleich zu HL-60/bcl-x<sub>L</sub> erfolgte freundlicherweise durch Herrn Prof. G. Wanner am Botanischen Institut der LMU München.

#### *Durchführung:*

HL-60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml), mit Ajoen (20  $\mu$ M) für 3 h behandelt, geerntet (360xg, 4°C, 10 min), einmal mit PBS gewaschen (4°C), in Fixans aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gekühlt.

#### *Lösungen:*

Fixans: 2,5% Glutaraldehyd in Fixanspuffer

Fixanspuffer: 75 mM Cacodylat, 75 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0

Fixierung: Die Probe wurde für mindestens 1 h in 2,5 % Glutaraldehyd in Fixanspuffer fixiert. Anschließend erfolgten Waschschrte mit Fixanspuffer für 5, 15, 30, 60 min. Die Probe wurde für 2 h in 1 % OsO<sub>4</sub> in Fixanspuffer nachfixiert. Schließlich wurde nochmals für 15 min mit Puffer, anschließend mit Wasser (Aqua dest.) (5, 30, 60 min) gewaschen. Die Proben wurden dann in aufsteigender Acetonreihe entwässert: 15 min mit 10 % Aceton, 30 min 1% UrAc (Uranylacetat) in 20 % Aceton (*en bloc* Kontrastierung), jeweils 15 min in 40 %, 60 %, 80 % Aceton und zuletzt für 15, 30 und 60 min in 100 % Aceton. Dann wurden die Proben mit Kunstharz (Spurr low-viscosity-Epoxyresin) infiltriert (Spurr/Aceton 1:1 (1 h), Spurr/Aceton 2:1 (2-5 h) und schließlich für mindestens 4 h in 100 % Spurr). Die Auspolymerisation erfolgte bei 65-70°C für 16 h.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem LEO EM 912 mit integriertem  $\Omega$ -Filter im „zero-loss-Mode“.

## 2.4 Detektion von Proteinen mittels Western Blot

#### *Aufarbeitung der Zellen:*

Die Aufarbeitung der Zellen für die Western Blot Analyse erfolgte je nach Fragestellung unterschiedlich (siehe dazu entsprechende Kapitel).

### *Lösungen und Durchführung:*

#### Zusammensetzung des Probenpuffers:

##### *Probenpuffer 5x:*

Tris-HCl 3,125 M, pH 6,8,	100 µl
SDS (Natriumdodecylsulfat) 20 %	250 µl
Glycerol	500 µl
Pyronin Y 5 %	5 µl
Dithiothreitol (DTT) 16 %	125 µl
Aqua dest.	20 µl

*Tabelle 8: Probenpuffer für Western Blot.*

Der Probenpuffer wurde bei -20°C gelagert. Der einfachkonzentrierte Probenpuffer (1x) wurde durch Verdünnung des fünffachkonzentrierten (5x) Puffers mit Wasser (Aqua dest.) hergestellt.

Nach der Proteinbestimmung (nach Lowry (Nucleiextraktionspuffer) oder Bradford (alle anderen)), wurde die Proteinlösung mit dem 5x Probenpuffer 1:4 verdünnt und bei 95°C für 5 min gekocht. So waren die Proteinproben für längere Zeit bei -20°C bzw. -85°C aufbewahrbar. Bevor die Proben in die Probentaschen des SDS-Polyacrylamidgels eingebracht wurden, sind sie mit dem 1x Probenpuffer auf ein bestimmtes Endvolumen aufgefüllt worden, nochmals für 5 min bei 95°C gekocht und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gekühlt worden.

### **2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen wurde nach Lämmli<sup>117</sup> durch die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe wird durch den Zusatz von SDS, das sich an die Proteine anlagert, erreicht. SDS ist negativ geladen und überdeckt die proteineigenen Ladungen. Weiterhin werden reduzierende Agentien, wie z.B. Dithiothreitol (DTT) zu den Proben zugegeben, um eine Aufspaltung der Disulfidbrücken in den Proteinen zu erreichen. Durch Vergleich mit Standardproteinen (z.B. low range Rainbowmarker RPN 720 der Firma Amersham mit Molekulargewichten (MG) von 2-46 kDa) lässt sich die Molekülmasse der detektierten Proteine abschätzen. Alternativ wurden kommerziell erhältliche Negativ- bzw. Positivkontrollen parallel mit auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Gel Apparatur der Firma BioRad (Mini Protean II Cell) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Vertikalsystem, mit

dem zwei Gel-Läufe parallel durchführbar sind. Nach der Elektrophorese wurden die zu detektierenden Proteine spezifisch durch Immunoblot (siehe Kapitel 2.4.2) nachgewiesen.

#### *Lösungen:*

Zur Herstellung der Gele wurde eine 30 %ige Polyacrylamid (PAA) / Bisacrylamid Stammlösung der Firma Roth verwendet.

#### Trenngel (z.B. 15 % Gel):

PAA/Bisacrylamid 30%ig	11,25 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	5,625 ml
SDS 10 % (m/V)	0,225 ml
Aqua dest.	5,4 ml

*Tabelle 9: Trenngel.*

Die Lösung wurde 10 min an der Vakuumpumpe entgast.

Erst dann wurde N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter zugesetzt:

TEMED	22,5 µl
APS (10 %) (m/V)	112,5 µl

#### Sammelgel:

PAA/Bisacrylamid (30 %)	2,55 ml
1,25 M Tris HCl, pH 6,8	1,5 ml
SDS 10 % (m/V)	0,15 ml
Aqua dest.	10,5 ml
10 min entgasen	
TEMED	30 µl
APS 10 % (m/V)	150 µl

*Tabelle 10: Sammelgel.*

#### Elektrophoresepuffer:

Tris-Base	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

*Tabelle 11: Elektrophoresepuffer.*

Nach dem Zusammenbau der Gelapparatur wurde das Trenngel vorsichtig zwischen die Glasplatten eingefüllt (1,5 mm Spacerdicke) und zur Polymerisation mit Wasser (Aqua dest.) überschichtet. Dann wurde die



Wasserschicht entfernt und die Sammelgellösung eingebracht. Die Kämme wurden aufgesteckt und die Apparatur mindestens 30 min zur Polymerisation stehen gelassen. Schließlich wurden die Proben in die Taschen eingefüllt und die Elektrophorese (Sammellauf: 100 V, 21 min; Trennlauf 200 V; 36 min) durchgeführt.

## 2.4.2 Immunologischer Nachweis fixierter Proteine auf PVDF Membranen

(Semi-dry Blotting mit diskontinuierlichen Puffersystem)

### *Blotting:*

Die Anwesenheit von speziellen Proteinen im Lysat von Zellen konnte spezifisch durch Western Blot nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (s. Kapitel 2.4.1) wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF Membran, Millipore, Eschborn) transferiert. Verwendet wurde die Methode des Semi-dry Blotting. Hier handelt es sich um zwei horizontale Graphitelektroden (BioRad), zwischen denen der elektrophoretische Proteintransfer vom Gel zur Membran stattfindet.

### *Lösungen:*

#### *Anodenpuffer I*

Tris	15 g
Methanol	100 ml
Aqua dest.	400 ml

*Tabelle 12: Anodenpuffer I.*

#### *Anodenpuffer II*

Tris	1,5 g
Methanol	100 ml
Aqua dest.	400 ml

*Tabelle 13: Anodenpuffer II.*

#### *Kathodenpuffer*

$\epsilon$ -Amino-n-capronsäure	2,6 g
Methanol	100 ml
Aqua dest.	400 ml

*Tabelle 14: Kathodenpuffer.*

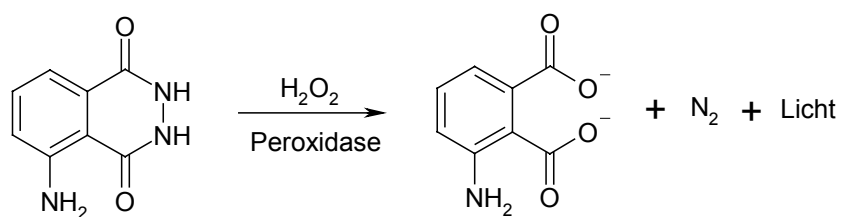
Die Membran wurde zunächst 5 min in Methanol geschwenkt, anschließend 5 min in Wasser (Aqua dest.) geschüttelt und bis zur Verwendung in Anodenpuffer II aufbewahrt.

Auf die Anode wurden zunächst Filterpapiere, getränkt mit Anodenpuffer I gelegt, dann Filterpapiere, welche in Anodenpuffer II getaucht wurden. Darauf folgen die Membran und das Gel. Anschließend wurden Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt und aufgelegt, die Apparatur geschlossen (Biometra, Göttingen) und ein Stromfluß von  $64 \text{ mA}/80 \text{ cm}^2$  ( $0,8 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ) für 45-60 min angelegt. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems führt zu einem effektiven und gleichmäßigen Proteintransfer.

Nach dem Blotten wurde die Membran in einem Trockenschrank bei  $85^\circ\text{C}$  getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer 5 % Lösung von Magermilchpulver (Blotto, Bio Rad) oder 2 % BSA (Sigma) in TBS-T geschüttelt. Dann inkubierten wir die Membran mit dem Erst-Antikörper über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ . Nach der Inkubation wurde die Membran 3x 10 min mit TBS-T gewaschen und dann 1 Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper gegen den konstanten Teil des Erst-Antikörpers inkubiert (siehe Tabelle 16). Im Anschluß wurde die Membran wiederum 3x 10 min mit TBS-T gewaschen und die Proteinbande mittels ECL-System von NEN und digitaler Kamera (Kodak Digital Science Image Station 440 CF) nachgewiesen.

#### *Detektion:*

Der zweite Antikörper ist an das Enzym Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelt. Durch nachfolgende Inkubation der Membran mit Substrat (Luminol und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kommt es an der Stelle, wo das gesuchte Protein vorliegt, zu einer Chemilumineszenz-Reaktion. Chemisch handelt es sich um eine Oxidation von Luminol (zyklisches Diacylhydrazin) in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Peroxidase. Bei dieser Reaktion entsteht Licht (428 nm). Die Intensität kann durch Zusatz von Verstärkern (Enhancer, z.B. Phenole) erhöht werden (Fa. NEN, Renaissance<sup>®</sup> Plus). Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit einer Kamera detektiert (Kodak Digital Science Image Station 440 CF).



**Abb. 13: ECL-Detektion**

**Lösungen:**

Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBS-T), pH 8,0	
Tris	3 g
NaCl	11,1 g
Tween 20	1 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
auf pH 8,0 einstellen	

*Tabelle 15: Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween.*

In Tabelle 16 sind die verwendeten Antikörper, die Methode der Blockierung der Membran, und die Verdünnungsfaktoren der Antikörperlösungen zusammengefasst:

<b>Zusammensetzung der verwendeten Antikörper und Inkubationslösungen:</b>				
1. Antikörper	Blockierung	Verdünnung 1. Antikörper	2. Antikörper	Verdünnung 2. Antikörper
Phospho-Akt (Ser 473) (Cell Signaling)	2 % BSA	1:1000	Anti-Rabbit (Dianova)	1: 1000
Bcl-x <sub>S/L</sub> (Santa Cruz)	5 % Blotto	1:200	Anti-Rabbit (Santa Cruz)	1:1000
Bcl-2 (Santa Cruz)	5 % Blotto	1:200	Anti-Goat (Santa Cruz)	1: 1000
Caspase-3-HRP (Transduction Lab.)	5 % BSA	1:1000	-	-
Caspase-8 Anti-FLICE mAb C15 (Carsten Scaffidi)	2 % BSA in PBS-T	1:5	Goat Anti-Mouse IgG <sub>2b</sub> (Southern Biotech Assoc.)	1:20000 in TBS-T
Cytochrom c 7H8.2C12 (PharMingen)	5 % Blotto	1:1000	Anti-Mouse (Cell Signaling)	1:1000
Cytochrom Oxidase subunit I (MoBiTec)	5 % Blotto	1 µg/ml	Anti-Mouse IgG2 <sub>a,k</sub> (Biozol)	1:4000
PARP (Ab-2) (Calbiochem- Novabiochem)	5 % Blotto	1:1000	Anti-Mouse (Cell Signaling)	1:1000
Phospho-ERK1/2 (Cell Signaling)	5 % Blotto in TBS-T	1:2000	Anti-Mouse (Cell Signaling)	1:1000
Phospho-JNK (Cell Signaling)	2 % BSA in TBS-T	1:1000	Anti-Mouse (Cell Signaling)	1:1000
Phospho-p38 (Cell Signaling)	2 % BSA in TBS-T	1:2000	Anti-Mouse IgG <sub>1</sub> (Serotec)	1: 1000

*Tabelle 16: Zum immunologischen Nachweis verwendete Antikörper (Western Blot).*

### 2.4.3 Anfärben von Proteinbanden im Gel

#### *Coomassiefärbung*

Nach dem Transfer des Proteins auf die Membran wurden die Gele in einer essigsäuren Brilliant Blue R 250 (Coomassie)-Lösung (Sigma) für 30 min eingelegt und geschüttelt. Der Farbstoff Brilliantblau bindet an das restliche, nicht-transferierte Protein und erzeugt mit diesem blaue Banden im Gel. Überschüssiges Coomassie wird mit einer Entfärbelösung (ethanolische Essigsäure) durch wiederholte Waschvorgänge entfernt, bis der Gelhintergrund durchsichtig wird und die Proteinbanden sich blau abheben.

Der Nachweis von Proteinen mittels Coomassie-Lösung ist eine relativ empfindliche Nachweismethode (1-15 µg Protein). Die Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Auftragemenge sowie der Blotting-„Erfolg“ geschah visuell.

#### *Lösungen:*

<u>Coomassie Färbelösung</u>	
Coomassie (Sigma) (m/V)	0,3 %
Ethanol (V/V)	45 %
Eisessig (V/V)	10 %
Aqua dest.	44,7 %
<u>Coomassie Entfärbelösung</u>	
Ethanol (V/V)	30 %
Eisessig (V/V)	10 %
Aqua dest.	60 %

*Tabelle 17: Coomassie Färbelösung und Entfärbelösung.*

#### **2.4.4 Färbung von PVDF-Membranen**

Die geblottete Membran wird mit einer Lösung von 0,1 % Ponceau S (3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-2,7-naphthalindisulfonsäure] (m/V) (Sigma) in Essigsäure (5 %) versetzt (Staining-Protokoll der Fa. Sigma, Deisenhofen).

*Prinzip:* Ponceau S ist ein negativ geladener Azofarbstoff der sich an die positiv geladenen Aminosäuren eines Proteins bindet.

*Durchführung:* Direkt nach dem Blotten oder der Chemilumineszenz-Reaktion wird die Membran mit Ponceau-Lösung 5 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird der Überschuss an Ponceau-Lösung zur Wiederverwendung aufgefangen und die Membran mit Wasser (Aqua dest.) so lange gespült bis der Membranhintergrund klar erscheint. Nun erfolgte die visuelle oder densitometrische Auswertung. Danach wurde die Membran 10-30 sec, bis zum Verschwinden der Banden mit 0,1 M Natronlauge, dann nochmals mit Wasser (Aqua dest.) gewaschen. Anschließend erfolgte die Trocknung der Membran. Dann wurde weiter verfahren wie unter Kapitel 2.4.2 beschrieben.

### 2.4.5 Ablösen von Antikörpern von PVDF-Membranen

Wenn verschiedene Proteine auf PVDF Membranen nacheinander auf der gleichen Membran mit verschiedenen Antikörpern detektiert werden sollten, wurden bereits gebundene Antikörper von den Membranen abgelöst. Hierzu waren die Membranen für 30 min bei 50°C oder für 1 h bei Raumtemperatur mit Ablösepuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol) unter Schütteln zu inkubieren. Anschließend wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen. Danach wurde, wie unter Kapitel 2.4.2 beschrieben, durch ECL-Detektion überprüft, ob der Antikörper vollständig von der Membran dissoziiert war. Die behandelte Membran wurde anschließend nochmals für 1 h auf dem Schüttler mit 5 % Blotto zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungstellen geschüttelt und anschließend mit neuem Erst-, dann Zweit-Antikörper behandelt. Dieses Verfahren wurde z.B. zur Detektion von Cytochrom c Oxidase oder der Bcl-x<sub>L</sub> Expression nach Cytochrom c Detektion angewendet.

### 2.4.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte, je nach Proteinmenge und Verträglichkeit mit dem eingesetzten Lysepuffer, nach der Methode von Bradford oder nach der von Lowry.

#### 2.4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode erfolgte nach dem BioRad-Proteinassay<sup>®</sup> Protokoll der Firma BioRad <sup>118</sup> (microassay procedure für < 25 µg/ml Protein). Verwendet werden blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet werden. In Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu verschiebt sich z.B. das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau G250 von 465 nm zu 595 nm <sup>119</sup>.

#### *Durchführung:*

1 µl der Proben mit unbekannter Proteinkonzentration wurden mit 799 µl PBS und 200 µl des Farbstoffkonzentrates (BioRAD-Proteinassay<sup>®</sup>, Coomassie-Brilliantblau) versetzt, durchmischt, und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm am Photometer (Perkin-Elmer Lambda Bio 20) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter BSA-Konzentration (0-20 µg).

### 2.4.6.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Lowry-Methode ist eine Kombination von Biuret- mit Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich ein Protein-Cu<sup>2+</sup> Komplex. Dieser unterstützt die Reduktion von Molybdat und Wolframat (als Heteropolyphosphorsäuren eingesetzt) durch vornehmlich Thyrosin und Tryptophan. Dabei wird vermutlich Cu<sup>2+</sup> im Kupfer-Proteinkomplex zu Cu<sup>+</sup> reduziert, das dann mit Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reagiert. Durch die zusätzliche Farbreaktion ist die Sensitivität gegenüber dem reinem Biuret-Assay stark gesteigert <sup>119</sup>.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Vorschrift von Perkin-Elmer (5-200 µg/ml Proteinkonzentration).

#### Lösungen:

Reagenz A:		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , wasserfrei	10 g	
0,1 M NaOH	500 ml	
Reagenz B:		
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,5 g	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,25 g	
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml	
Reagenz 1:	Reagenz A	50 ml
	Reagenz B	1 ml
Reagenz 2:	Folin's Reagenz (Sigma)	1:1
	verdünnen	

*Tabelle 18: Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry.*

#### Durchführung:

1 ml Reagenz 1 wurden mit 200 µl Probe versetzt, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Reagenz 2 hinzu pipettiert, geschüttelt und 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 750 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer erstellten Eichgeraden mit Proben bekannter BSA-Konzentration (0-40 µg/ml, Sigma).

## 2.4.7 Aufbereitung der Zellen für die Western Blot Analyse

### 2.4.7.1 Untersuchung der Cytochrom c-Freisetzung

Zur Untersuchung, ob Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird, müssen zytosolische und „mitochondriale“ Fraktionen bereitete werden. Allerdings enthält die hier sogenannte „mitochondriale Fraktion“ Zellfragmente und andere Zellorganelle. Das Zytosol wird bei dieser Methode aus der Zelle herausgewaschen und mittels Western Blot Analyse untersucht (s.a. Abb. 14).

#### *Prinzip:*

Digitonin (auch „Digitin“), ein Saponin aus Digitalis-Arten, bildet mit dem Cholesterin der Zellmembran Komplexe, was zu Löchern in der Zellmembran führt. Der eingesetzte iso-osmotische digitoninhaltige Puffer bewirkt ein Auswaschen des Zellinhalts (Zytosols). Die mitochondriale Membran ist durch das Digitonin nicht betroffen und wird nicht permeabilisiert, da ihre Membran weniger Cholesterin enthält. Außerdem reicht die gewählte Einwirkzeit des Digitonins nur zur Permeabilisierung der äußeren Zellmembran. Das in das Zytosol freigesetzte Cytochrom c wird anschließend immunologisch bestimmt<sup>120</sup>.

#### *Lösungen:*

##### Permeabilisierungspuffer :

210 mM D-Mannitol
70 mM Sucrose (frisch herzustellen)
10 mM HEPES
5 mM Natriumsuccinat
0,2 mM Natrium-EGTA
0,15% BSA (Bovine Serum Albumin)
80 µg/ml Digitonin (Sigma)

*Tabelle 19: Permeabilisierungspuffer zur Cytochrom c-Bestimmung.*

Der pH-Wert wurde mit stark verdünnter Natronlauge bei 4°C auf pH 7,4 eingestellt.

Von den einzelnen Pufferbestandteilen wurden Stocklösungen (in Wasser, dest.) hergestellt und bei -20°C eingefroren. Der Permeabilisierungspuffer sowie die Sucrose-Stocklösung wurden immer frisch hergestellt. Die Digitonin-Einwaage erfolgte immer frisch.



*Durchführung* (die gesamte Aufarbeitung erfolgte auf Eis):

Zellen ( $3 \times 10^6$ ) wurden in 24-Well Platten ausgesät und mit 20  $\mu$ M Ajoen für die angegebenen Zeiten inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (300xg). Das erhaltene Pellet wurde in 4°C kaltem Permeabilisierungspuffer (ca. 80-100  $\mu$ l) aufgenommen und vorsichtig bei 4°C für 15-20 min geschüttelt. Die permeabilisierten Zellen wurden bei 4°C und 300xg zentrifugiert, der Überstand, der Zytosol und freigesetztes mitochondriales Cytochrom c enthielt, abgenommen. Das Pellet wurde inzwischen gekühlt (4°C) aufgehoben. Der Überstand wurde nun nochmals zentrifugiert (4°C, 10 min, 13000xg) um größere Zellbruchstücke zu entfernen. Nach der Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 2.4.6), wurde die erhaltene zytosolische Fraktion mit 5x Probenpuffer verdünnt, bei 95°C gekocht und bei -20°C eingefroren. Das aufgehobene Pellet enthält Zellfragmente mit Organellen („mitochondriale Fraktion“). Dieses Pellet wurde nochmals bei 13000xg zentrifugiert, um es sorgfältig vom „restlichen Zytosol“ zu befreien. Es wurde in 0,1 % Triton-X-100/PBS aufgenommen, mit der Pipettenspitze suspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend homogenisierte man die Suspension mit einem Ultraschallstab (5 Zyklen), dann wurde bei 12000xg (10 min, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand, der mitochondriales Protein enthielt („mitochondriale Fraktion“), wurde abgenommen. Ein Teil wurde zur Proteinbestimmung nach Bradford aufbewahrt. Die mitochondriale Fraktion wurde ebenfalls in 5x Puffer aufgenommen, bei 95°C gekocht und bis zur Elektrophorese bei -20°C aufgehoben.

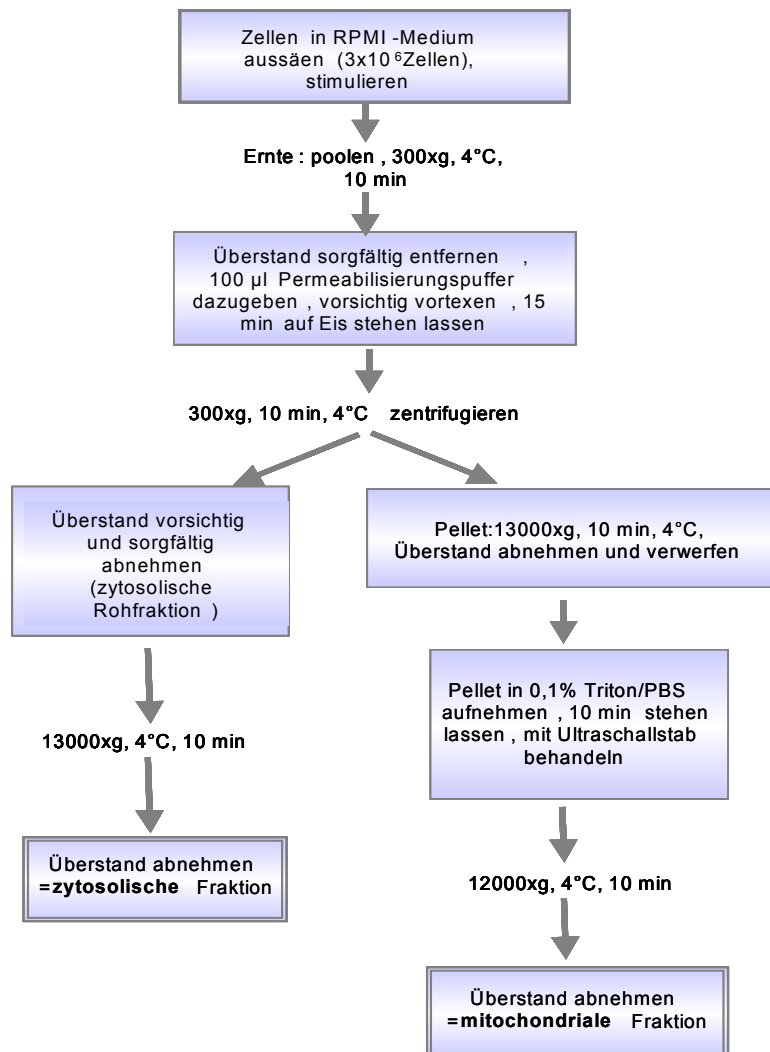


Abb. 14: Flussschema der Cytochrom c-Bestimmung.

Der Nachweis von Cytochrom c in der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion erfolgte durch SDS-PAGE (15 % Gel) und anschließenden Western Blot (s.a. Tabelle 16 verwendete Antikörper).

#### *Untersuchung der Abhängigkeit der Cytochrom c-Freisetzung von aktivierten Caspasen*

Der Nachweis erfolgte nach Vorinkubation von HL-60 Zellen mit dem Breitspektrumcaspaseinhibitor z-VAD-fmk und anschließender Stimulation der Zellen für 0-24 h. Die zytosolische Fraktion wurde wie oben beschrieben bereitet. Die Analyse der Proteinfraction erfolgte durch SDS-PAGE (15 % Gel) und anschließend durch Western Blot Analyse.

*Nachweis der Cytochrom c Oxidase als Kontrolle für das Vorliegen eines Zytosols frei von mitochondrialer Kontamination*

Dies geschah durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (s. Tabelle 16). Nach Proteintransfer der zytosolischen bzw. mitochondrialen Fraktion auf die PVDF-Membran wurde der Blot wie unter 2.4.2 beschrieben behandelt. Ein anderer Weg war, eine bereits zum Nachweis von Cytochrom c verwendete Membran vom Antikörper zu befreien (s.a. 2.4.5) und entsprechend weiterzubehandeln.

#### 2.4.7.2 Detektion von Bcl-2 Familienmitgliedern

*Bcl-x<sub>L</sub> Expression in HL-60, HL-60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen*

Die Expression der Bcl-2 Familienmitglieder wurde wie in Kapitel 2.4.7.4 (Detektion der Caspasespaltprodukte) mittels Western Blot bestimmt. Alternativ wurden Blots, die zur Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung verwendet wurden, vom Antikörper befreit und wie unter 2.4.5 beschrieben weiterbehandelt.

*Detektion von phosphoryliertem Bcl-2-Protein*

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte analog der Vorschrift zur Detektion der Phosphorylierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK, s.a. 2.4.7.3) im Western Blot.

Auch erfolgte der Nachweis u.a. nach Ablösen der Antikörper von Membranen nach bereits erfolgter MAPK-Detektion (s.a. Kapitel 2.4.5 Ablösen von Antikörpern von PVDF Membranen).

#### 2.4.7.3 Probenvorbereitung zur Detektion der Aktivierung von MAPK (JNK, p38, ERK1/2) und von Proteinkinase B/Akt

*Prinzip:* Der Nachweis der Aktivierung erfolgte durch spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte (= aktivierte Form) der MAPK JNK, p38, ERK1/2 (s.a. Tabelle 16 verwendete Antikörper) bzw. der Proteinkinase B/Akt. Dabei mussten Phosphatasehemmer (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaF) zugegeben werden, die die Dephosphorylierung der Proteine durch aktive Phosphatasen verhinderten.

*Durchführung:**Lysepuffer:*

EDTA	2 mM
NaCl	137 mM
Glycerol	10%
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	20 mM
Tris	20 mM
Triton-X-100	1 %
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P x H <sub>2</sub> O	20 mM
NaF	10 mM
frisch zusetzen:	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	2 mM
PMSF	1 mM
Complete™	q.s.

*Tabelle 20: Lysepuffer zur Detektion der Aktivierung von MAPK (JNK, p38, ERK1/2) und von Proteinkinase B/Akt.*

Zur Bestimmung der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wurde wie folgt vorgegangen:

1x 10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden für die angegebenen Zeiten (siehe jeweils Ergebnisse) mit Ajoen (20 µM) inkubiert. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, der Überstand abgenommen. Das Pellet nahm man in Lysepuffer auf und ließ die Suspension für 15 min bei 4°C stehen. Anschließend homogenisierte man mit Ultraschall (5 Zyklen) und zentrifugierte bei 11000xg für 10 min bei 4°C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (s. Kapitel 2.4.6.1). Die Proben wurden anschließend wie unter Kapitel 2.4 beschrieben für die Elektrophorese und für die Western Blot Analyse vorbereitet.

*Vorinkubationen:*

Um die Bedeutung der MAPK-Aktivierung für die Ajoen-induzierte Apoptose festzustellen, wurde mit spezifischen Inhibitoren 1 h lang vorinkubiert:

SB 203580 (100 µM) zur Inhibierung der JNK

U 0126 (10 µM) zur Inhibierung der Aktivierung von ERK1/2

Wortmannin (50-200 nM) zur Inhibierung der PI<sub>3</sub>K (Phosphatidylinositol-3 Kinase).

Anschließend erfolgte die Stimulierung mit Ajoen (20 µM) und die weitere Aufarbeitung (s.o.).

In Tabelle 21 sind die jeweiligen untersuchten MAPK im jeweiligen Zelltyp und die eingesetzten Inhibitoren der MAPK, zusammengefasst:

<b>Verwendete Zelllinien, vorinkubierte Substanzen im Western Blot</b>		
Proteinkinase	Zelltyp (Western Blot)	Vorinkubationen (Western Blot)
JNK	HL-60 HL60/neo, HL60/bcl-x <sub>L</sub> , HL-60/DN-JNK	SB (100 µM); z-VAD-fmk (100µM) -
p38	HL-60	-
ERK1/2	HL-60	U 0126 (10 µM)
Akt	HL-60	Wortmannin (100 nM)

*Tabelle 21: Verwendete Zelllinien, vorinkubierte Substanzen für die Western Blot Analyse.*

#### 2.4.7.4 Probenvorbereitung zur Detektion der aktiven Spaltprodukte von Caspasen und zur Detektion von gespaltenem PARP

##### Lysepuffer für die Caspasen- und PARP-Aufarbeitung (Western Blot):

Triton-X-100	1%
NaCl	0,15 M
Tris-HCl, pH 7,4	10 mM
Complete™	q.s.

*Tabelle 22: Lysepuffer für die Caspasenaufarbeitung (Western Blot Analyse).*

Die Zellen wurden in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$ /ml in 24-Well Platten ausgesät und vor Stimulation mindestens 1 Stunde „ruhen“ gelassen. Nach der angegebenen Expositionsdauer mit Stimulans (s.a. Ergebnisse) zentrifugierte man die Zellen, wusch sie zweimal mit PBS (4°C) und lysierte sie sofort in Lysepuffer für 30 min bei 4°C. Das Lysat wurde durch Ultraschall homogenisiert (5 Zyklen) und anschließend bei 10000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford <sup>118</sup> bestimmt (s.a. Kapitel 2.4.6.1). Die weitere Vorbereitung für die Western Blot Analyse geschah wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben (s.a. Tabelle 16 der verwendeten Antikörper).

##### Vorinkubationen:

Um zu untersuchen, ob N-Acetylcystein (NAC) die Aktivierung der Caspase-3 unterbindet, wurde wie folgt vorgegangen:

HL-60 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden ausgesät, blieben unbehandelt (Ko) oder wurden 3 h mit NAC (15 mM) vorinkubiert. Anschließend wurde mit Ajoen (20 µM) für 6 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen auch nur mit NAC

(15 mM) behandelt. Die Aufarbeitung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

## 2.5 Nachweis von Transkriptionsfaktor AP-1 mittels Elektrophoretic-Mobility-Shift Assay (EMSA)

Die Durchführung des EMSA erfolgte freundlicherweise von Fr. B. Weiss analog der Referenz <sup>122</sup> (dort näher beschrieben).

*Prinzip:* Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die im Nukleus an DNA-Promotorsequenzen binden und dadurch die Transkription von Genen regulieren. Der Nachweis der DNA-Bindungsaktivität erfolgt mittels eines Gelretardationsassays (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) <sup>121</sup>.

Es werden Kern (Nuclei)-Extrakte hergestellt und die Bindung von Kernproteinen (Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1)) an spezifische DNA-Bindungssequenzen analysiert. Dies erfolgt durch Inkubation des Nukleieextraktes mit einer für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Bindungssequenz. Das Gemisch an Kernprotein gebunden an DNA-Oligonukleotide, wird durch Elektrophorese aufgetrennt. Dabei zeigt der gebildete Komplex aus Protein und DNA, aufgrund seiner Größe ein anderes Laufverhalten als das freie, ungebundene Oligonukleotid (daher der Name Gelretardierungsassay).

### 2.5.1 Vorbereitung für EMSA

#### *Nucleipräparation:*

<b>Puffer A:</b>	
HEPES pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
frisch: DTT	1 mM
PMSF	0,5 mM
<b>Puffer B:</b>	
HEPES pH 7,9	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Glycerol	25 %

*Tabelle 23: Puffer für die Nucleipräparation.*

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt:

$1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in 24-Well Platten ausgesät und mit Ajoen (20  $\mu$ M) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 360xg (4°C, 10 min) geerntet und 3x mit PBS gewaschen, das erhaltene Pellet in 400  $\mu$ l Puffer A aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis stehen gelassen, bevor 25  $\mu$ l NP-40 (10 %) hinzupipettiert wurden. Sofort wurde stark gevortext. Anschließend wurde die Suspension bei 14800xg (4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das erhaltene Pellet wurde nun in 50  $\mu$ l Puffer B aufgenommen, 15 min bei 4°C kräftig geschüttelt, anschließend 5 min bei 14800xg zentrifugiert. Der Überstand enthält die isolierte Nucleipräparation. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode (siehe Kapitel 2.4.6.2). Die Nucleipräparation wurde bis zur Verwendung bei -85°C eingefroren.

### 2.5.2 EMSA

Die eingesetzte Oligonucleotidsequenz AP-1 (1,75 pmol/ $\mu$ l) stammte von der Fa. Promega (Promega, Mannheim).

## 2.6 Nachweis der Caspase-3-ähnlichen Aktivität mittels DEVD-Spaltungsassays

Die Durchführung des „DEVD-Spaltungs-Assays“ erfolgte freundlicherweise durch Dr. H. Hentze (Universität Konstanz).

*Prinzip:* Die Caspase-3-ähnliche Aktivität wird durch Abspaltung von freiem, fluoreszierenden afc aus dem Caspasesubstrat DEVD-afc ermittelt. Das freigewordene 7-Amino-4-trifluormethylcoumarin (afc) wird fluorimetrisch vermessen <sup>14</sup>.

Vorbereitung:

Die Zellen wurden in 24-Well Platten ( $4 \times 10^5$ /ml) ausgesät, mit Ajoen (20  $\mu$ M) oder mit Etoposid (10  $\mu$ g/ml) für 0-22 h inkubiert. Geerntet wurde durch Zentrifugation, die Pellets wusch man anschließend zweimal mit eiskaltem PBS. Die Lyse erfolgte durch Resuspension in Lysepuffer und anschließenden Einfrier-Auftau-Zyklen (viermal). Die Lysate wurden bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt.

*Lysepuffer:*

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EGTA	1 mM
Triton-X-100	0,1 %
HEPES, pH 7,5	25 mM
Complete®	q.s.

*Tabelle 24: Lysepuffer zur Bestimmung der Caspase-3-ähnlichen Aktivität.*

## 2.7 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind, falls nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Statistische Vergleiche erfolgten durch Berechnungen mit ANOVA, gefolgt von vergleichenden Tests nach Dunnett oder Bonferroni oder durch ungepaarte zweiseitige Student's tests (unpaired two tailed student's t-test). p-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angenommen.



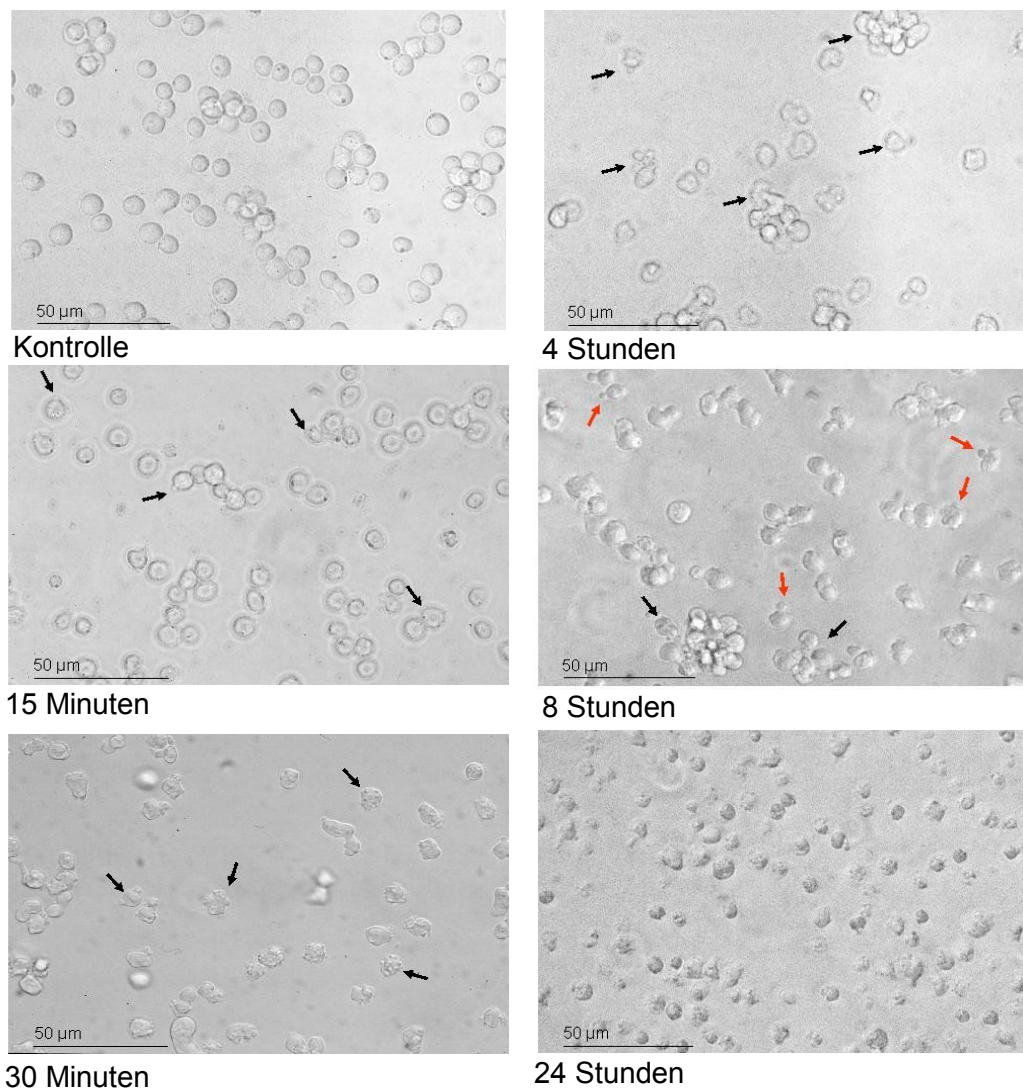
### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Ajoen induziert Apoptose**

##### **3.1.1 Morphologie**

###### **3.1.1.1 Lichtmikroskopisch erfassbare Veränderungen**

Ajoen induziert die typischen morphologischen Veränderungen einer Zelle, die durch Apoptose stirbt (s.a. Einleitung 1.2.2). Diese sind durch lichtmikroskopische Aufnahmen belegt (Abb. 15). Die unbehandelten Zellen (Kontrolle) erscheinen rund von einheitlicher Größe. Kurze Zeit (15 min) nach Stimulation mit Ajoen (20  $\mu$ M) treten Ausstülpungen auf, die Zellen beginnen zu „brodeln“ (15 min/30 min). Nach 4-8 h Inkubation schnüren die Zellen sog. „apoptotic bodies“ ab und schließen sich zu Zellverbänden („Cluster“) zusammen, eine Beobachtung, die für Ajoen typisch zu sein scheint<sup>82</sup>. Die 24 h Aufnahme zeigt im wesentlichen geschrumpfte Zellen kurz vor der Zellyse .



**Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Zellen.**  
 HL-60 Zellen wurden mit Ajoen (20 µM) 0-24 h stimuliert. Nach den angegebenen Zeiten (15 min, 30 min, 4 h, 8 h und 24 h) wurden die Zellen fotografiert. Kontrolle: unbehandelte Zellen; 15/30 min: die Zellen verändern sich an ihrer Oberfläche, einzelne Ausbuchtungen entstehen; 4 h/8 h: die ersten Abschnürungen (apoptotische Körperchen) sind zu erkennen (helle Pfeile), daneben ballen sich die Zellen zu Zellverbänden (Cluster, schwarze Pfeile) zusammen; 24 h: die Zellen sind stark geschrumpft, es liegen hauptsächlich Zellfragmente vor. Vergrößerungen der Bilder siehe Anhang 1A und 1B.

### 3.1.1.2 Durchflusszytometrische Detektion morphologischer Veränderungen

Sowohl die auftretende Schrumpfung als auch die steigende Granulierung der Zellen nach Ajoen-Stimulation konnte am Durchflusszytometer beobachtet werden. Durch die verstärkte Granulierung erfolgt eine erhöhte Streuung des Laserlichts seitwärts (erhöhte SSC-Werte). Die Schrumpfung der Zellen

während des Apoptoseverlaufs lässt sich durch eine Abnahme des Vorwärtsstreulichtwertes feststellen (erniedrigte FSC-Werte). Unbehandelte Zellen bilden eine einheitliche „Zellwolke“ bezüglich ihres erzeugten Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (Kontrolle), während nach Ajoen-Stimulation (20  $\mu$ M, 6 h bzw. 24 h) eine zweite „Zellwolke“ sichtbar wird (Abb. 16). Diese stellt die geschrumpften und stark granulierten Zellen dar, gekennzeichnet durch einen hohen Seitwärtsstreulichtwert und einen verringerten Wert des Vorwärtsstreulichts. Die erhöhte Granulierung ist auf Veränderungen im Zytoplasma zurückzuführen. Die Schrumpfung erklärt sich durch die Abschnürung der sog. apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“) und durch Wasserverlust. Das Apoptose-induzierende Chemotherapeutikum Etoposid (17  $\mu$ M, 24 h) wurde als Kontrolle<sup>123,124</sup> eingesetzt. Die typische Schrumpfung der Zellen und die Erhöhung der Granularität ist gut zu beobachten.

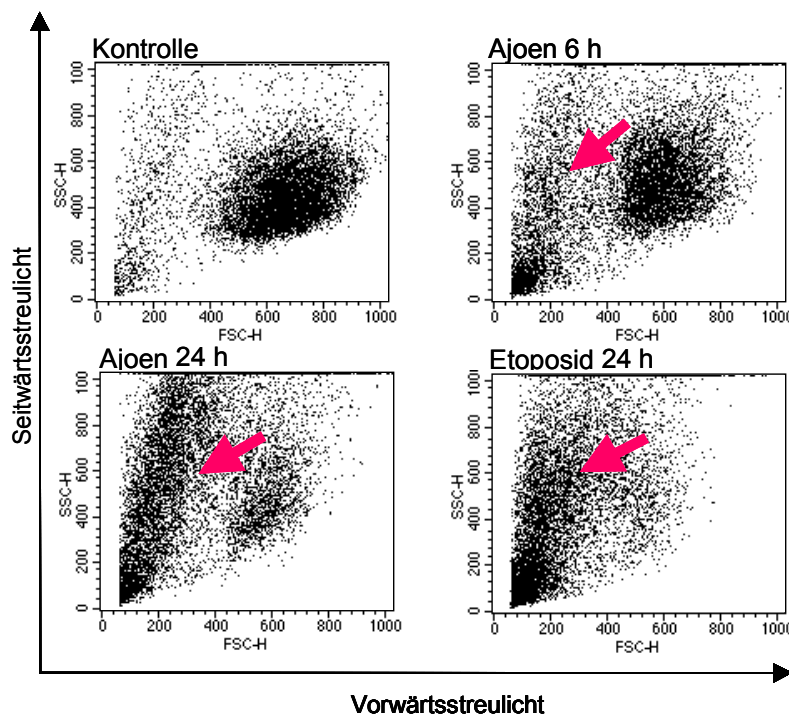
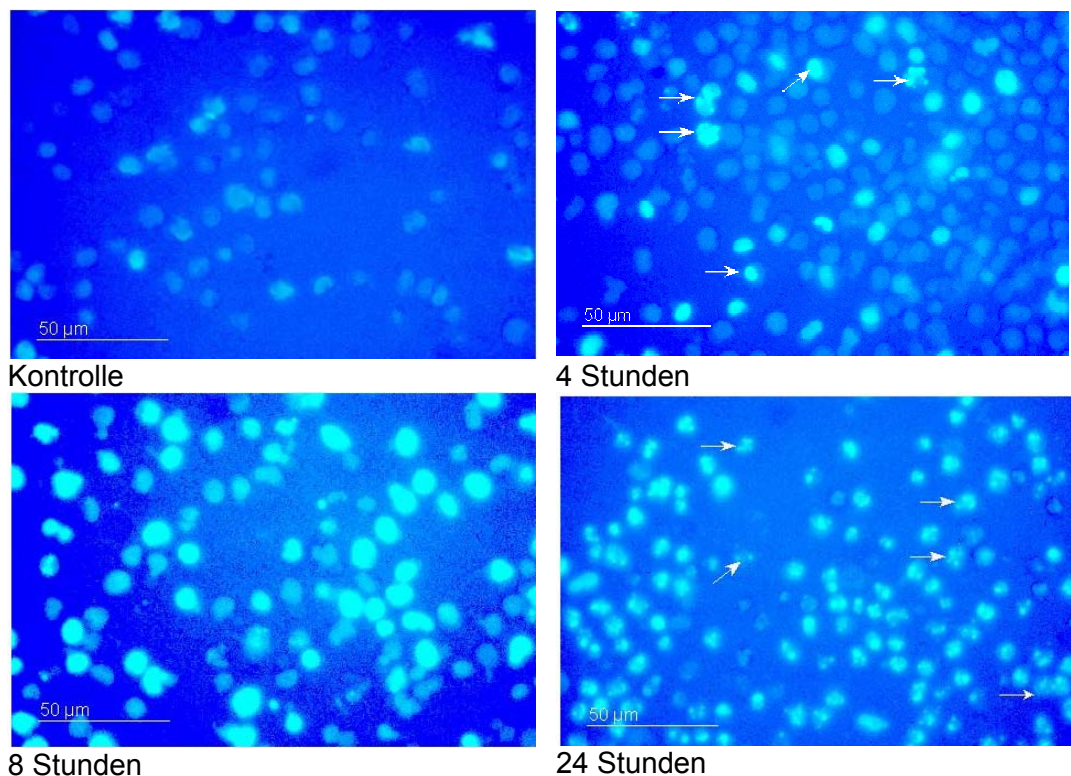


Abb. 16: Morphologische Veränderungen detektiert mittels FACS. Stimulation von HL-60 Zellen mit 20  $\mu$ M Ajoen für 6 oder 24 h. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Positivkontrolle: Behandlung der Zellen mit Etoposid (17  $\mu$ M, 24 h). Markierung der apoptotischen „Zellwolke“ mit Pfeil.

### 3.1.1.3 Morphologische Veränderungen des Zellkerns

#### 3.1.1.3.1 Nachweis der DNA-Kondensation im Fluoreszenzmikroskop

HL-60 Zellen wurden mit Ajoen (20  $\mu$ M) 0 bis 24 h behandelt und die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt. In unbehandelten Kontrollzellen ist das Chromatin über den Zellkern gleichmäßig verteilt, wodurch eine nur schwache, aber gleichmäßige Fluoreszenz verursacht wird. Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Verdichtung (Kondensation) des Chromatins. Dies zeigt sich durch eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität im Zellkern. Nach 24 h können die Kernfragmente (s.a. Einleitung) gut detektiert werden (Abb. 17).



**Abb. 17:** Detektion der kondensierten DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie. HL-60 Zellen wurden mit Ajoen (20  $\mu$ M) für die angegebenen Zeiten stimuliert (0-24 h), mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. CN: Kontrolle; Zellen mit schwach blauer Fluoreszenz; vereinzelt Spontanapoptose. 4 h: Auftreten einer verstärkten Fluoreszenz in den Zellen = DNA-Kondensation (Pfeile); 8 h: die Zahl der Zellen mit verdichtetem Chromatin nimmt stark zu; 24 h: nahezu alle Zellen weisen kondensiertes Chromatin auf, der Kern ist stark fragmentiert (Pfeile). Vergrößerungen siehe Anhang 2.

### 3.1.1.3.2 Detektion von Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt

Die Fragmentation der DNA führt zu Kernen mit sub-diploidem DNA-Gehalt. Das Auftreten dieser Kerne kann zur Detektion und Quantifizierung von Apoptose herangezogen werden: Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt (apoptotische Zellen) werden mittels Propidiumjodid-Färbung im Durchflusszytometer (nach Nicoletti et al., 1991<sup>109</sup>) erfasst (s.a. Einleitung). Der auftretende Bereich unterhalb des  $G_0/G_1$ -Peaks (sub- $G_1$ ) (Abb. 18) kann mittels CELLQuest Software quantitativ ausgewertet werden (Becton Dickinson, Heidelberg). Abb. 18 zeigt die durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehaltes von HL-60 Zellen, die nicht Ajoen ausgesetzt waren (Kontrolle) und Zellen, die für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$  Ajoen inkubiert waren.

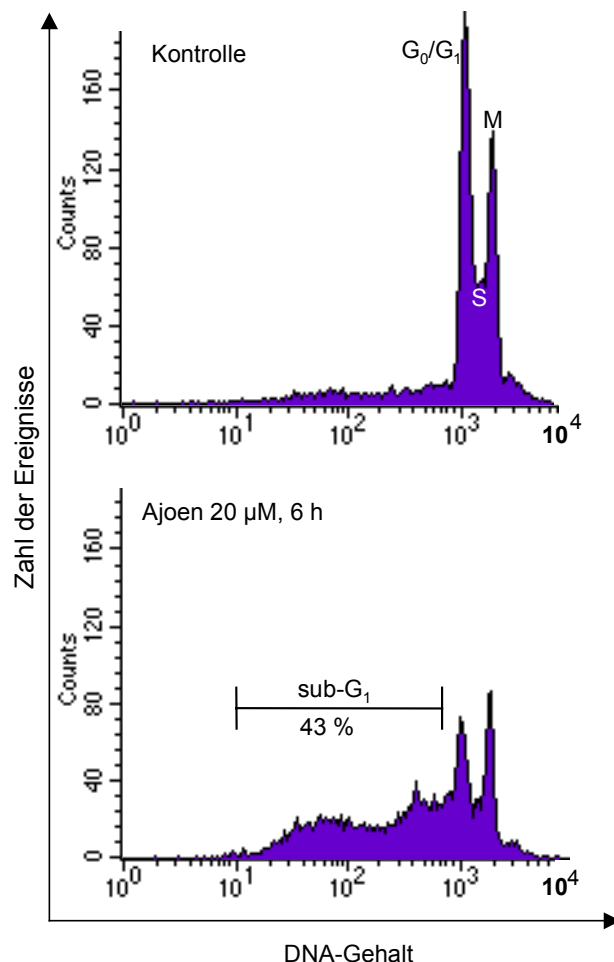


Abb. 18: Durchflusszytometrische Darstellung des DNA-Gehaltes der Zellen. Abb. oben: unbehandelte Zellen nach Propidiumjodid-Färbung. Abb. unten: HL-60 Zellen wurden mit Ajoen (20  $\mu\text{M}$ ) für 6 h behandelt. Der auftretende sub- $G_1$ -Bereich wurde mittels CELLQuest Software quantitativ ausgewertet (nach Nicoletti et al.<sup>109</sup>).

### 3.1.2 Die Induktion der Apoptose durch Ajoen erfolgt konzentrations- und zeitabhängig

Nachdem nun feststand, dass Ajoen Apoptose in HL-60 Zellen induziert, interessierte die Frage nach der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit.

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit (0-24 h) mit der Ajoen Apoptose in HL-60 Zellen induziert, erfolgte durch Bestimmung des auftretenden sub-G<sub>1</sub>-Bereichs mittels Durchflusszytometrie. Bereits nach 5 h Inkubation mit Ajoen (20 µM) konnte ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate ermittelt werden (Abb. 19).

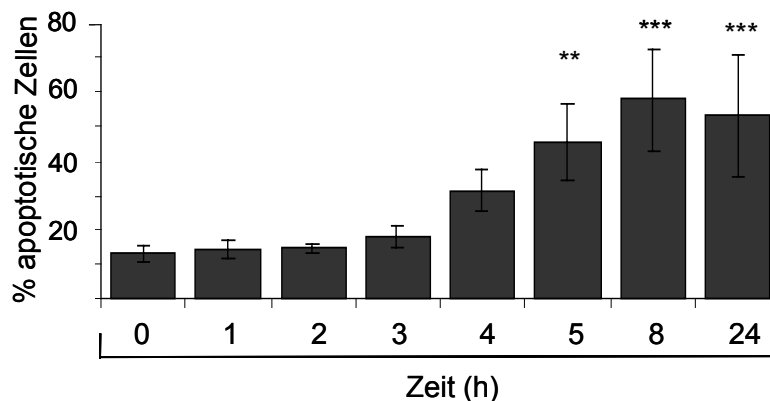


Abb. 19: Zeitabhängige Induktion der Apoptose in HL-60 Zellen durch Ajoen (20 µM). Messung der Apoptoserate durchflusszytometrisch durch Zählung der Kerne mit sub-diploidem DNA-Gehalt (sub-G<sub>1</sub>). Mittelwert  $\pm$  SEM dreier unabhängiger Experimente, jeweils als Dreifachbestimmung. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Bonferroni).

Der nachfolgende MTT-Test (MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) demonstriert die Konzentrationsabhängigkeit des Ajoen-induzierten Zelltodes. HL-60 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Ajoen (0-60 µM) für 24 h stimuliert und die respiratorische Aktivität der Zellen bestimmt. Ajoenkonzentrationen ab 2,5 µM induzierten signifikant den apoptotischen Zelltod (maximal eingesetzte Konzentration 60 µM) (Abb. 20). Die Ermittlung der LD<sub>50</sub> erfolgte rechnerisch mit Graph Pad Prism® Software und ergab für Ajoen eine LD<sub>50</sub> von 11,7 µM.

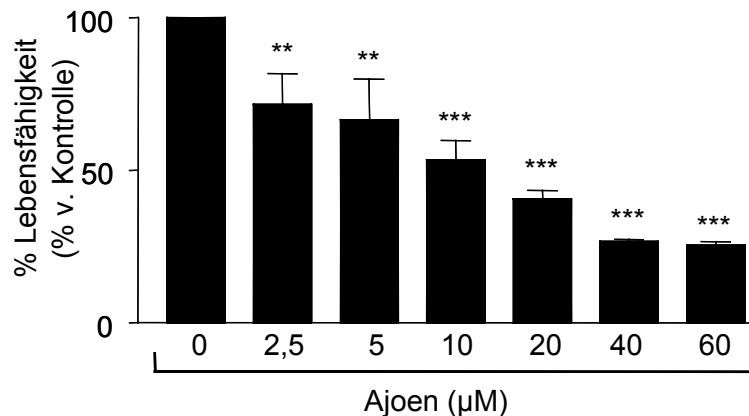


Abb. 20: Konzentrationsabhängige Induktion des Zelltodes durch Ajoen. Stimulation von HL-60 Zellen für 24 h mit steigenden Konzentrationen Ajoen (2,5-60 µM) und Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen mittels MTT-Test, ausgedrückt als Prozent von Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten (in Dreifachbestimmung). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Bonferroni).

## 3.2 Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg

### 3.2.1 Ajoen induziert die Aktivierung von Caspasen

#### 3.2.1.1 Nachweis der Caspase-3-ähnlichen Aktivität

Caspasen sind die „Effektoren“ der Apoptose. Sie greifen die Zellbausteine (Kernmembran, Aktinfilamente etc., s.a. Einleitung 1.2.4) an und führen so zu den morphologischen und biochemischen Veränderungen in der Zelle. Der Nachweis einer Caspase-3-ähnlichen Aktivität erfolgte mittels des fluorimetrischen „DEVD-afc Spaltungs-Assays“<sup>14</sup>. Der Assay wurde freundlicherweise für uns von Herrn Dr. H. Hentze (Universität Konstanz) durchgeführt. Nach 8 h Inkubation mit Ajoen (20 µM) konnte ein signifikanter Anstieg der Caspaseaktivierung beobachtet werden (Abb. 21).



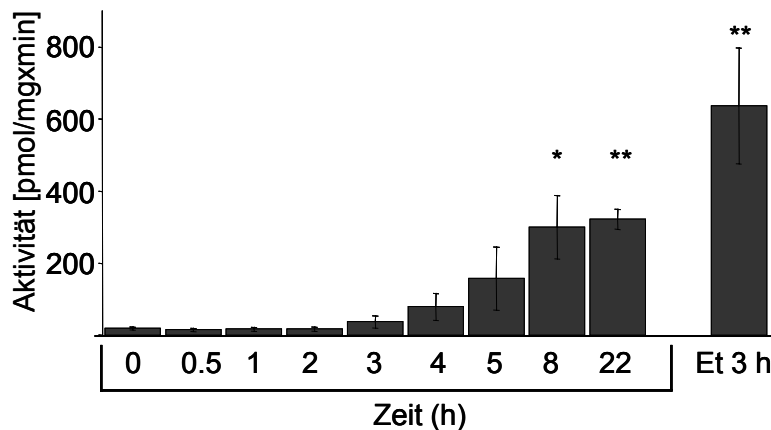


Abb. 21: Bestimmung der Caspase-3-ähnlichen Aktivität. Ajoen Behandlung (20  $\mu$ M) für 0,5-22 h, dann Durchführung des „DEVD-afc Spaltungs-Assays“. Etoposid diente als Positivkontrolle (Et, 10  $\mu$ g/ml, 3 h). Mittelwerte  $\pm$  SEM dreier unabhängiger Experimente, durchgeführt als Dreifachbestimmung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (ANOVA/Dunnett).

### 3.2.1.2 Detektion der PARP-Spaltung

Ein Substrat der aktivierten Caspase-3 ist PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase). Die Spaltung von PARP ist ein Marker für die Caspase-3-ähnliche Aktivität und damit für den apoptotischen Zelltod (s.a. 1.2.3). Aktivierte Caspase-3 spaltet PARP, ein 116 kDa schweres Protein, in ein 89 kDa und 27 kDa schweres Fragment. Die Untersuchung der PARP-Spaltung erfolgte mittels Western Blot. Ajoen induziert zeitabhängig die Spaltung von PARP (Abb. 22).

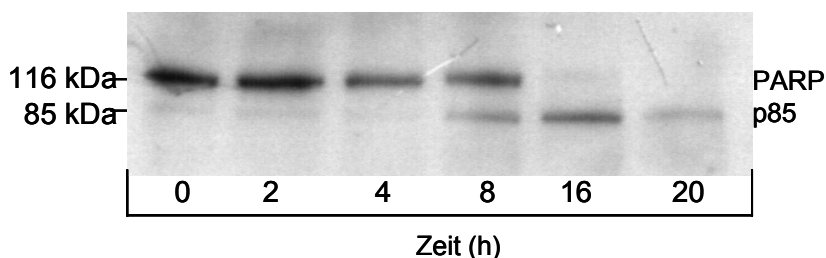


Abb. 22: Ajoen induziert zeitabhängig die Spaltung von PARP. Inkubation von HL-60 Zellen mit Ajoen (20  $\mu$ M) für 0-20 h. Auftrennung von 40  $\mu$ g Protein/Bande mittels 10 % SDS-PAGE. Detektion von PARP mittels monoklonaler Antikörper.



### 3.2.1.3 Die Ajoen-induzierte Apoptose verläuft abhängig von Caspasen

Nachdem gezeigt war, dass Caspasen im Verlauf der Ajoen-induzierten Apoptose aktiviert werden, stellte sich die Frage, ob diese für den apoptotischen Prozess notwendig sind. Dazu wurden HL-60 Zellen mit einem Breitspektrumcaspaseinhibitor („Pan-Caspaseinhibitor“, z-VAD-fmk<sup>125,126</sup>) 1 h vorinkubiert (100  $\mu$ M) und anschließend mit Ajoen (20  $\mu$ M, 8 h) stimuliert. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch nach Nicoletti et al.<sup>109</sup> bestimmt. Der Caspasehemmer verhinderte die Ajoen-induzierte DNA-Fragmentation (Abb. 23). Die Aktivierung von Caspasen ist für die Ajoen-induzierte Apoptose also notwendig.

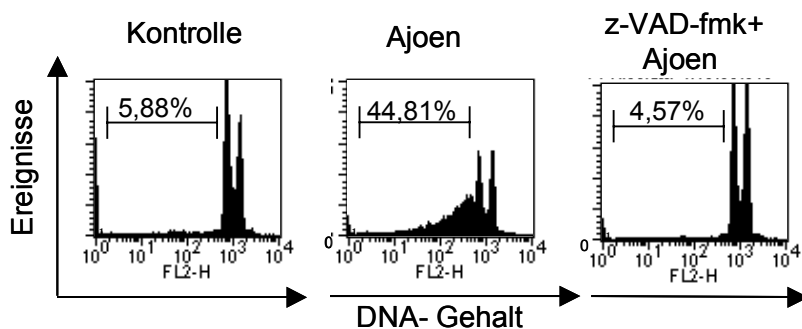


Abb. 23: Der Caspaseinhibitor z-VAD-fmk verhindert die Ajoen-induzierte DNA-Fragmentation. Vorinkubation von HL-60 Zellen mit 100  $\mu$ M z-VAD-fmk für 1 h. Anschließende Behandlung der Zellen mit Ajoen (20  $\mu$ M, 8 h). Bestimmung der Apoptoserate durchflusszytometrisch nach Färbung der Zellkerne mit Propidiumjodid.

### 3.2.1.4 Welche Caspasen werden aktiviert?

Um die involvierten aktiven Caspasen genauer zu bestimmen, wurde die Aktivierung der sog. Effektorcaspase-3 und der Initiatorcaspase-8 untersucht. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen die jeweilige aktive Form der Caspasen eingesetzt (s.a. 1.2.4.2). Die Behandlung von HL-60 Zellen mit Ajoen (20  $\mu$ M) für 0-24 h führt zur Spaltung der Procaspase-3 in ihre aktive Untereinheit p17. Das aktive Fragment p17 der Caspase-3 erscheint nach ca. 4 h. Im Zeitraum von 5 bis 8 h wird die Bande intensiver. Dieses Ergebnis beweist die Aktivierung der Effektorcaspase-3 (Abb. 24).

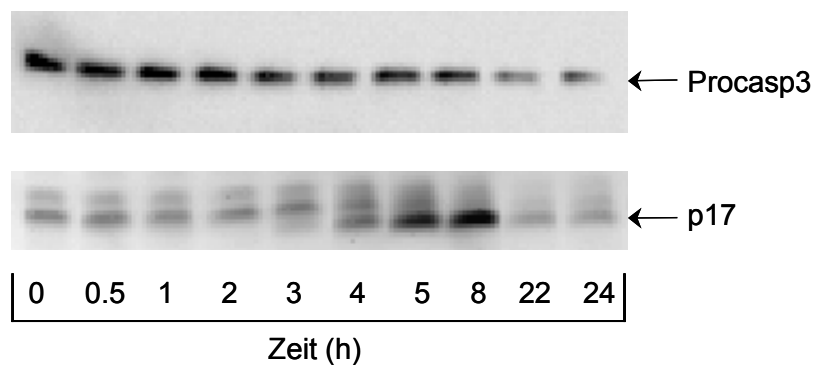


Abb. 24: Ajoen induziert die Aktivierung der Procaspase-3. Spaltung der Procaspase-3 in ihre aktive Untereinheit p17. Stimulation von HL-60 Zellen für 0-24 h mit 20  $\mu$ M Ajoen. Auftrennung von 50  $\mu$ g Protein mittels 15 % SDS-PAGE. Detektion der Caspase-3 mittels monoklonaler Antikörper.

Die Caspase-8-Proform wird in zwei Isoformen, Caspase-8/a (55 kDa) und Caspase-8/b (53 kDa), exprimiert. Die Aktivierung erfolgt durch Spaltung in die Intermediate p41 und p43, welche schließlich zur aktiven p18 Untereinheit fragmentieren. Abb. 25 zeigt das zeitabhängige Auftreten der p41 und p43 Intermediate 4 h nach Ajoen-Gabe (20  $\mu$ M).

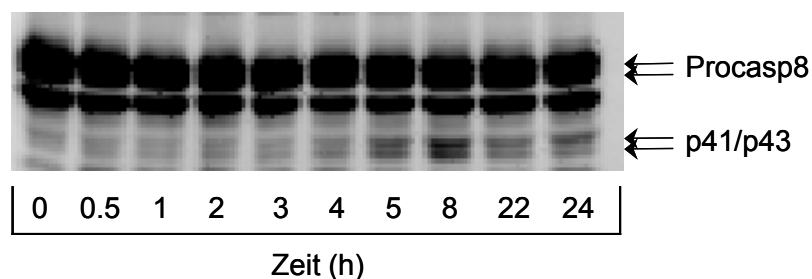


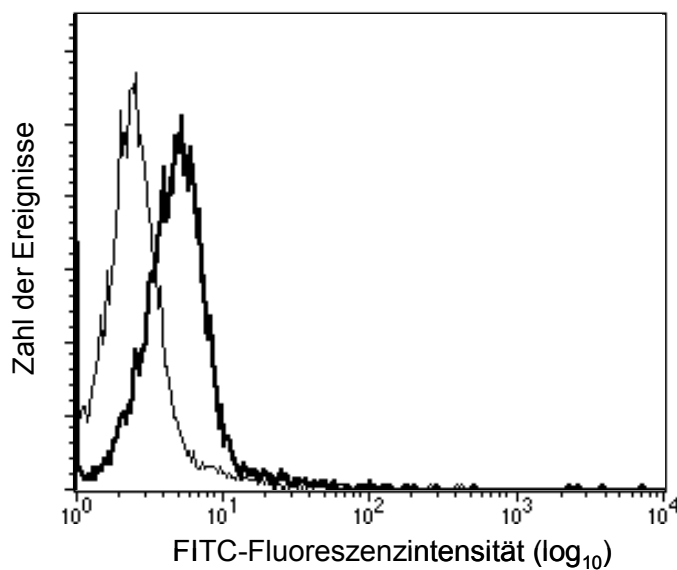
Abb. 25: Ajoen induziert die Aktivierung der Procaspase-8. Inkubation von HL-60 Zellen mit Ajoen (20  $\mu$ M, 0-24 h). Auftrennung von 50  $\mu$ g Protein mittels 10 % SDS-PAGE. Detektion mittels monoklonaler Antikörper gegen Caspase-8.

Die Aktivierung der Caspase-8 gilt als wichtiges Ereignis in der CD95/CD95L-induzierten Apoptose<sup>127,128</sup> (s.a. Einleitung 1.3.1.1). Der Nachweis der Caspase-8 Aktivierung ließ einen Zusammenhang mit dem CD95/CD95L-System vermuten.

### 3.2.2 Untersuchungen zur CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose

#### 3.2.2.1 Expression des CD95-Rezeptors auf HL-60 Zellen

Zunächst wurde mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie untersucht, ob der in dieser Studie verwendete HL-60 Klon überhaupt CD95-Rezeptoren besitzt.



*Abb. 26: HL-60 Zellen exprimieren den CD95-Rezeptor. Immunfluorimetrische Analyse von HL-60 Zellen mittels Durchflusszytometrie (Histogramm). Inkubation der Zellen mit CD95-Rezeptor-Antikörper, anschließend mit einem zweiten FITC-konjugierten Antikörper (dicke Linie) oder Inkubation nur mit einer FITC-konjugierten Isotypenkontrolle (dünne Linie).*

Die detektierbare Rechtsverschiebung (erhöhte Fluoreszenzintensität) gegenüber der Isotypenkontrolle belegt die Expression von CD95-Rezeptoren auf HL-60 Zellen (Abb. 26).

Nun galt es zu untersuchen, ob das CD95/CD95L-System in der durch Ajoen provozierten Apoptose involviert ist:

### 3.2.2.2 Spielt das CD95/CD95L-System in der Ajoen-induzierten Apoptose eine Rolle?

#### 3.2.2.2.1 Einfluss von Ajoen auf die CD95-Rezeptorexpression

Für verschiedene zytotoxische Substanzen wurde gezeigt, dass sie die CD95-Rezeptorexpression erhöhen und somit die Empfindlichkeit der Zellen in Bezug auf die CD95-vermittelte Apoptose steigern<sup>129,130</sup>. Eine signifikante Erhöhung der CD95-Rezeptorexpression konnte im Vergleich zur Kontrolle (0 h) im Verlauf der Stimulation mit Ajoen (20  $\mu$ M, 0-6 h) nicht ermittelt werden (Abb. 27).

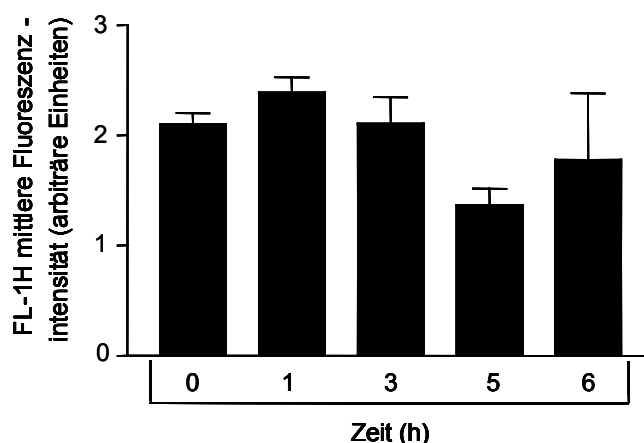


Abb. 27: Immunfluorimetrische Analyse der CD95-Rezeptorexpression. Inkubation von HL-60 Zellen nach Ajoen-Stimulation (0-6 h, 20  $\mu$ M) mit CD95-Rezeptor-Antikörper, anschließend mit FITC-konjugiertem sekundärem Antikörper, oder nur mit FITC-konjugiertem Antikörper. Mittelwerte (nach Abzug der erhaltenen Werte aus der Inkubation mit nur zweitem Antikörper) zweier unabhängiger Experimente (in jeweils 3 Ansätzen).  $p > 0,05$  (ANOVA/Bonferroni).

#### 3.2.2.2.2 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose mit CD95-Ligand

Vergleicht man die Datenlage bezüglich der Empfindlichkeit von HL-60 Zellen gegenüber CD95-Rezeptor-vermittelter Apoptose, so scheint die Empfindlichkeit der Zellen auf CD95-vermittelte Apoptose zu variieren<sup>130-132</sup>. Deshalb wurde überprüft, ob der ungebundene, natürliche Ligand (CD95L) des CD95-Rezeptors in unserem HL-60 Klon Apoptose induziert. Interessanterweise konnte der CD95L keine Apoptose in unserem Zellsystem

hervorrufen, auch nicht bei Einsatz hoher Konzentrationen des Liganden (330 ng/ml). Abb. 28 zeigt den Prozentanteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit Ajoen (20  $\mu$ M) und nach Inkubation mit löslichem (d.h. ungebunden vorliegenden) CD95-Liganden (330 ng/ml).

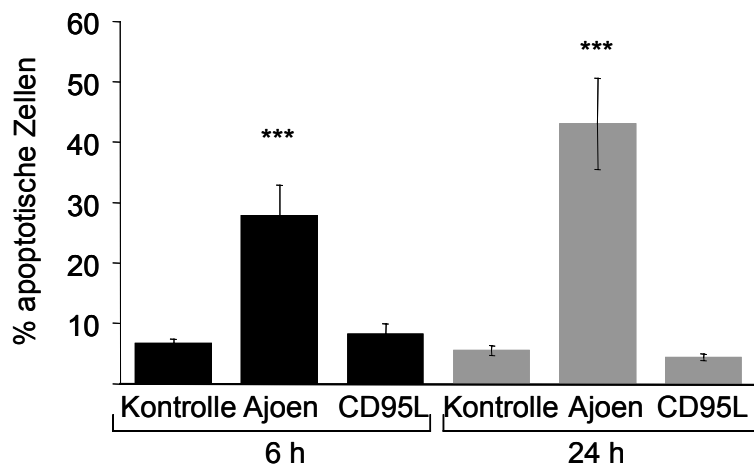


Abb. 28: CD95L induziert keine Apoptose in HL-60 Zellen. Durch Ajoen (20  $\mu$ M) und freien (ungebundenen, löslichen) CD95L (330 ng/ml) induzierte Apoptose nach 6 h (dunkle Balken) und nach 24 h (graue Balken) Inkubation (nach Nicoletti et al.<sup>109</sup>). Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten, in Dreifachbestimmung. \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Bonferroni).

Um zu überprüfen, ob Ajoen das Potential besitzt, den CD95-Rezeptor gegen CD95L zu sensibilisieren, inkubierten wir HL-60 Zellen 1 h mit Ajoen (20  $\mu$ M) vor und behandelten die Zellen dann mit CD95L (330 ng/ml) für 6 bzw. 24 h. Die Apoptoserate der kombinierten Behandlung der Zellen mit Ajoen/CD95L unterscheidet sich nicht signifikant von der der alleinigen Ajoen Behandlung (Abb. 29). Die Möglichkeit der Sensibilisierung der CD95-Rezeptoren für CD95L durch Ajoen ist somit definitiv ausgeschlossen.

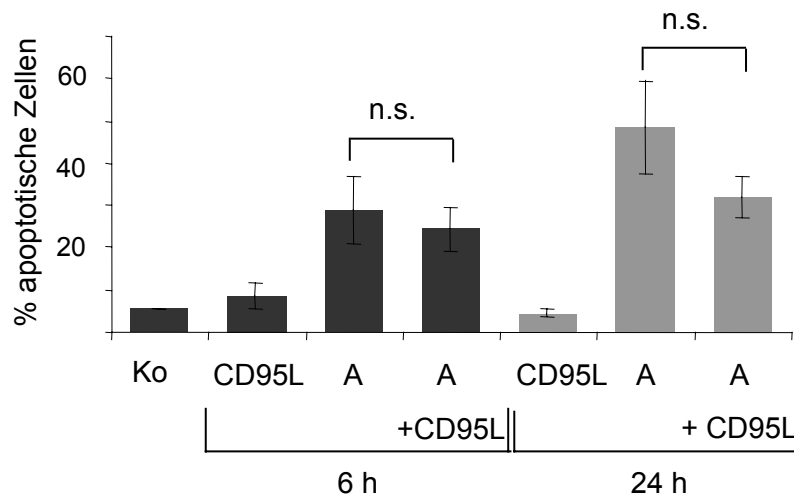


Abb. 29: Ajoen hat keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion. Vorinkubation mit Ajoen (20  $\mu$ M) für 1 h, anschließend Zugabe von CD95-Ligand (CD95L) (330 ng/ml, 6 h (schwarze Balken) bzw. 24 h (graue Balken)). Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate nach Propidiumjodid-Färbung. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten, in Dreifachbestimmung. n.s. = nicht signifikant (unpaired two-tailed student's t-test).

### 3.2.2.2.3 Apoptoseinduktion an CD95-resistenten Jurkat Zellen (Jurkat<sup>R</sup>)

Um eine CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose nach Ajoen-Exposition sicher auszuschließen, führten wir ein weiteres Experiment durch. Dazu bedienten wir uns zweier Zelllinien: Jurkat Zellen, die sensitiv auf CD95L reagieren und resistente Jurkat Zellen (Jurkat<sup>R</sup>), die keinen CD95-Rezeptor besitzen und folglich auf CD95L nicht mit Apoptoseinduktion reagieren<sup>101</sup>. Beide Zelllinien wurden mit Ajoen (20  $\mu$ M, 21 h) behandelt und die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt (Nicoletti et al.<sup>109</sup>): Eine Induktion des Zelltodes ist auch in Jurkat<sup>R</sup> Zellen gegeben (Abb. 30).

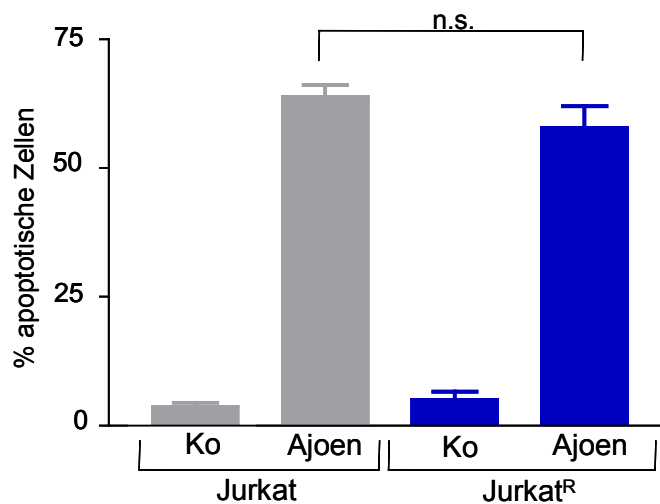


Abb. 30: Ajoen (20 µM) induziert Apoptose auch in CD95-resistenten Jurkat Zellen (Jurkat<sup>R</sup>).

Inkubation von Jurkat (graue Balken) und Jurkat<sup>R</sup> Zellen (blaue Balken) mit Ajoen (20 µM) für 21 h. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate nach Färbung der Kerne mit Propidiumjodid. Mittelwerte  $\pm$  SEM dreier unabhängiger Experimente, in Dreifachbestimmung. n.s. = nicht signifikant (unpaired two tailed student's t-test).

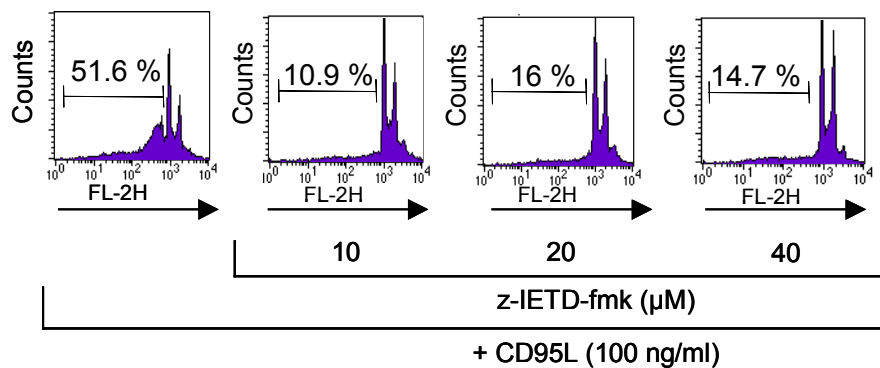
Nachdem wir nun gezeigt hatten, dass der CD95-Rezeptor in der Ajoen-induzierten Apoptose nicht involviert ist, untersuchten wir, ob die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 für die Ajoen-vermittelte Apoptose notwendig ist.

### 3.2.2.3 Notwendigkeit der Caspase-8 in der Ajoen-induzierten Apoptose

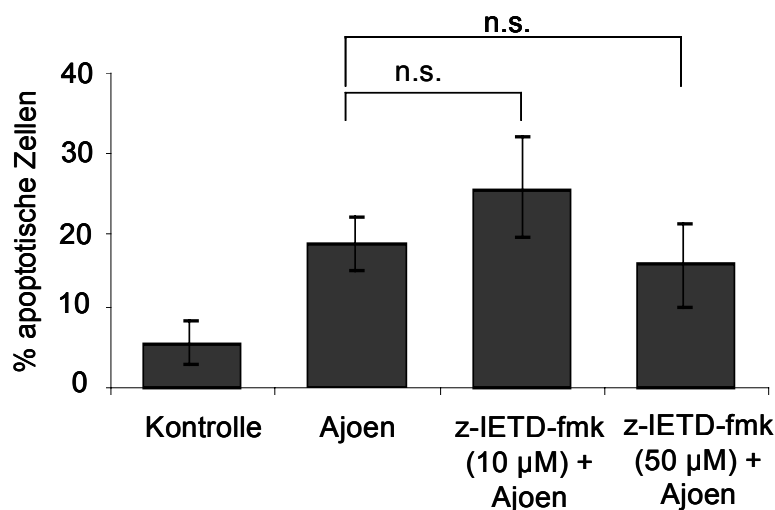
Die Initiatorcaspase-8 gilt als essentiell für die CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose. Sie wird „downstream“ des CD95-Rezeptors aktiviert (s.a. Einleitung Abb. 4). Um die Bedeutung der Aktivierung von Caspase-8 in der Ajoen-ausgelösten Apoptose zu untersuchen, setzten wir einen spezifischen Caspase-8 Inhibitor (z-IETD-fmk<sup>133,134</sup>) in den Konzentrationen 10 und 50 µM ein. Diese beiden Konzentrationen erwiesen sich an CD95L-sensitiven Jurkat Zellen als effektiv: die durch CD95L ausgelöste Apoptose konnte inhibiert werden (Abb. 31A). Es wurden keine höheren Konzentrationen eingesetzt, da dies zur unspezifischen Hemmung weiterer Caspasen führen könnte.

In HL-60 Zellen hatte die Hemmung der Caspase-8 keinen Einfluss auf die Ajoen-induzierte DNA-Fragmentation (Abb. 31B):

**A** Jurkat Zellen



**B** HL-60 Zellen



**Abb. 31:** Die Aktivierung der Caspase-8 hat keinen Einfluss auf die Ajoen-induzierte Apoptose.

**A** CD95L induziert in Jurkat Zellen Apoptose. Der Caspase-8-Hemmer kann diese verhindern. CD95L-sensitive Jurkat Zellen wurden mit CD95L (100 ng/ml) oder verschiedenen Konzentrationen z-IETD-fmk (10-40 μM) und anschließend mit CD95L inkubiert. Bestimmung der Apoptoserate mittels Bestimmung des sub-G<sub>1</sub>-Bereichs.

**B** Der Caspase-8-Hemmer kann die Ajoen-induzierte Apoptose in HL-60 Zellen nicht inhibieren. Inkubation mit Ajoen (20 μM) oder Vorinkubation mit z-IETD-fmk (10, 50 μM) für 1 h und anschließende Stimulation mit Ajoen (20 μM, 6 h). Bestimmung der Apoptoserate wie in A. Ergebnis dreier unabhängiger Experimente (in Dreifachbestimmung). n.s. = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni).

Die abschließende Analyse der Untersuchungen zum CD95-Rezeptor zeigt klar, dass die Ajoen-induzierte Apoptose in HL-60 Zellen nicht über den CD95-Rezeptor läuft, und dass die Aktivierung der Caspase-8 keine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion spielt.



Nachdem nun der extrinsisch verlaufende Signalweg über den CD95-Rezeptor ausgeschlossen ist, untersuchten wir, ob Ajoen Apoptose über den intrinsischen, Mitochondrien-kontrollierten Signalweg induziert.

### 3.2.3 Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg über Mitochondrien

Ein zweiter Signaltransduktionsweg, über den Apoptose vermittelt werden kann, verläuft über Mitochondrien (s.a. Einleitung 1.3.2). In diesem Signalweg ist eines der Schlüsselereignisse die Veränderung der Durchlässigkeit (Permeabilität) sowohl der inneren als auch der äußeren mitochondrialen Membran<sup>42,135,136</sup>. Die Permeabilisierung der äußeren Membran führt zur Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie z.B. Cytochrom c. Die Erhöhung der Durchlässigkeit der inneren Membran ist durch den Verlust des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\psi_m$ ) gekennzeichnet (s.a. Einleitung 1.3.2.2). Wir untersuchten nun, ob die Behandlung mit Ajoen zu Veränderungen der Permeabilität sowohl der inneren als auch der äußeren mitochondrialen Membran führt.

#### 3.2.3.1 Veränderungen an der äußeren mitochondrialen Membran - Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien

Mittels Western Blot untersuchten wir die Freisetzung von Cytochrom c aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien. Diese „Leckage“ ist die Folge einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren mitochondrialen Membran<sup>42,135</sup>. Der genaue Mechanismus wird in der Literatur noch diskutiert<sup>17</sup> (s.a. Einleitung). Die Untersuchungen ergaben eine zeitabhängige Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Abb. 32). Die obere Graphik in Abb. 32 zeigt die Analyse der aus den Mitochondrien gewonnenen Proteinfractionen, die untere zeigt diejenige aus dem Zytosol, nach verschieden langer Inkubation mit Ajoen (0-5 h) und entsprechender Aufarbeitung (s.a. Material und Methoden 2.4.7.1). Eine deutliche Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol kann man bereits nach 3-5 stündiger Stimulation mit Ajoen detektieren. Der Einsatz von Etoposid (E, 17  $\mu$ M) diente als Kontrolle<sup>54</sup>.

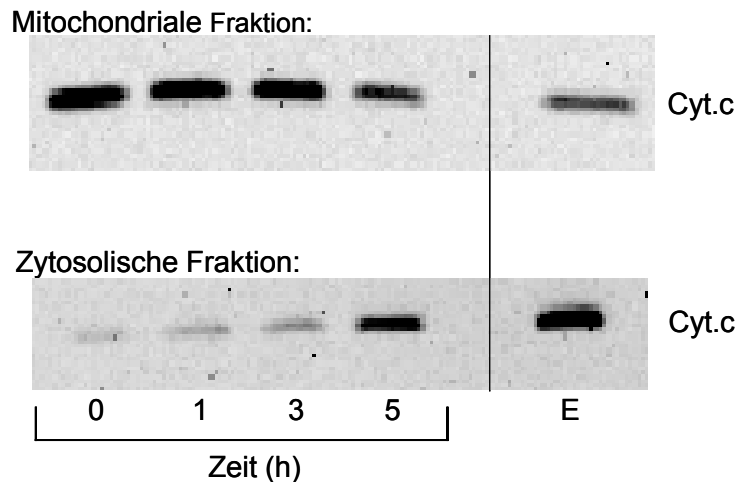


Abb. 32: Ajoen verursacht eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran.

Obere Abbildung: Zeitverlauf der Ajoen-induzierten Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien. HL-60 Zellen, nicht behandelt oder mit Ajoen (20  $\mu$ M) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Positivkontrolle mit Etoposid (E, 17  $\mu$ M, 5 h). Untere Abbildung: zeitabhängiges Erscheinen von Cytochrom c im Zytosol, nach Behandlung mit Ajoen (20  $\mu$ M). Herstellung der mitochondrialen und zytosolischen Fraktionen wie beschrieben. Auftrennung des Proteins über SDS-PAGE (15 % Gel). Detektion von Cytochrom c durch monoklonalen Antikörper.

### 3.2.3.1.1 Ausschluss einer mitochondrialen Kontamination in der Zytosolfraktion

Um eine mitochondriale Kontamination der zytosolischen Fraktion auszuschließen, wurde die durchgeführte Fraktionierung über ein spezifisch in den Mitochondrien vorliegendes Enzym, die Cytochrom c Oxidase (Untereinheit I) überprüft. Im Zytosol konnte die Cytochrom c Oxidase mittels des spezifischen Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Hingegen erhielt man ein deutliches Signal in der mitochondrialen Fraktion (Abb. 33).

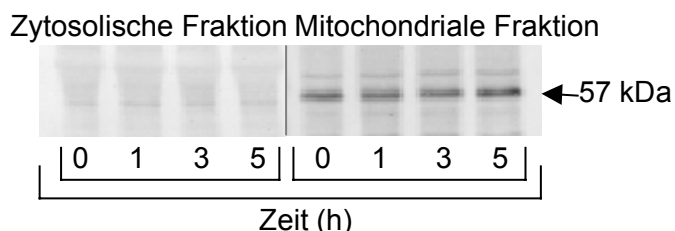


Abb. 33: Die zytosolische Fraktion ist frei von mitochondrialer Kontamination.

Die Membran aus Abb. 32 wurde nach der Cytochrom c Detektion vom Antikörper befreit und mit einem spezifischen Antikörper gegen Cytochrom c Oxidase, Untereinheit I, behandelt.

### 3.2.3.2 Untersuchungen zu Veränderungen an der inneren mitochondrialen Membran

#### 3.2.3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse mittels JC-1

Veränderungen im elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\psi_m$ ) wurden indirekt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 nachgewiesen. Abhängig vom vorliegenden Membranpotential bildet das Fluorochrom JC-1 rot fluoreszierende Aggregate oder Monomere mit Grünfluoreszenz. Abschwächung oder Verlust des elektrochemischen Gradienten führt zu einer Abnahme der Rotfluoreszenz. Dies kann am Durchflusszytometer verfolgt werden. Der sog. „Membranpotentialzusammenbruch“ erfolgte bereits 4 h nach Stimulation mit Ajoen (20  $\mu$ M) (Abb. 34).

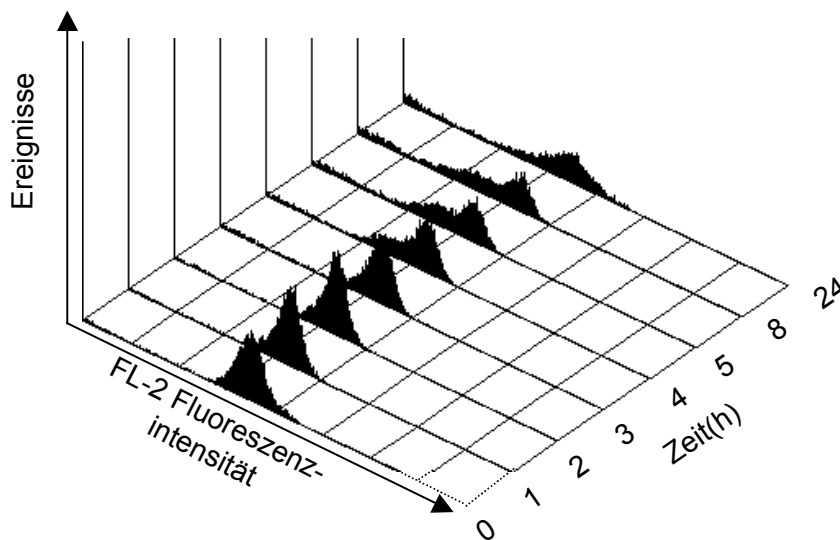
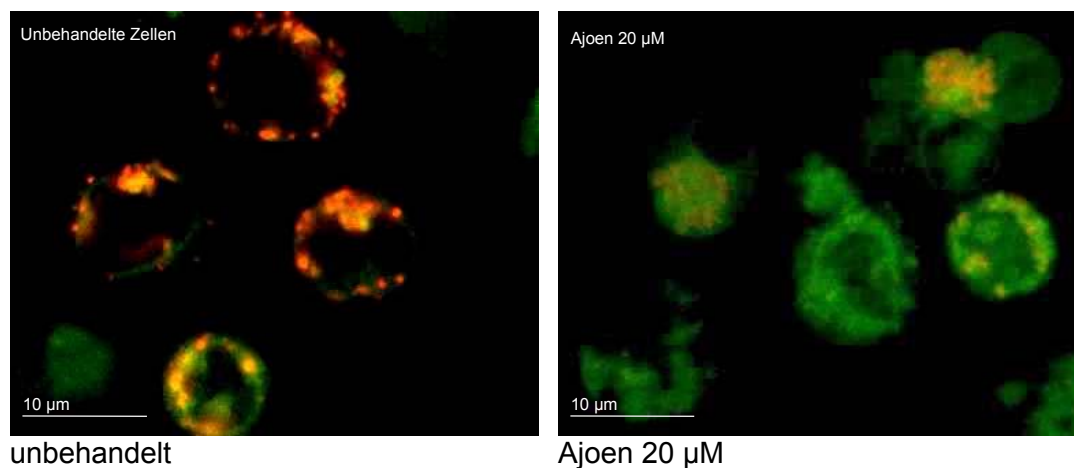


Abb. 34: Durchflusszytometrische Erfassung des mitochondrialen Membranpotentials.

HL-60 Zellen für 0-24 h mit Ajoen (20  $\mu$ M) behandelt, dann mit Fluoreszenzfarbstoff JC-1 beladen. Messung der rotfluoreszierenden Aggregate von JC-1 (= FL-2 Fluoreszenzintensität) durchflusszytometrisch. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials entspricht einer Reduktion der FL-2 Fluoreszenzintensität.

### 3.2.3.2.2 Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop

Zur Veranschaulichung des obigen Ergebnisses dienen nachfolgende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Das linke Bild (Abb. 35) zeigt unbehandelte Kontrollzellen, die nur mit JC-1 beladen wurden. Die Mitochondrien erscheinen vornehmlich rotfluoreszierend, was einem intakten elektrochemischen Gradienten entspricht. Im Gegensatz dazu, zeigt das rechte Bild Ajoen-behandelte Zellen (20  $\mu$ M, 8 h) mit nahezu nur grünlischer Fluoreszenz, ein Beweis für JC-1-Monomer-Bildung und Potentialverlust des elektrochemischen Gradienten.



*Abb. 35: Ajoen induziert einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Behandlung von HL-60 Zellen für 8 h mit Ajoen (20  $\mu$ M), Färbung mit JC-1. Anschließende Analyse der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Kontrollbedingungen: rote Fluoreszenz der JC-1 Aggregatform (linkes Bild, intakter elektrochemischer Gradient). Rechtes Bild: die Grünfluoreszenz entsteht durch JC-1 Monomerbildung nach Verlust des Membranpotentials durch Ajoen (20  $\mu$ M, 8 h).*

### 3.2.3.3 Die Cytochrom c-Freisetzung erfolgt unabhängig von aktivierten Caspasen

Um zu untersuchen, ob die Cytochrom c-Freisetzung von aktivierten Caspasen abhängt, setzten wir den Breitbandcaspaseinhibitor z-VAD-fmk ein. Wie auf Abb. 36 zu erkennen, kann der Caspaseinhibitor die Freisetzung von Cytochrom c nicht verhindern. Die Freisetzung von Cytochrom c erfolgte also relativ früh (3-4 h) noch vor der Aktivierung der Caspasen (signifikant nach 8 h, Abb. 21, Aktivitätsassay).

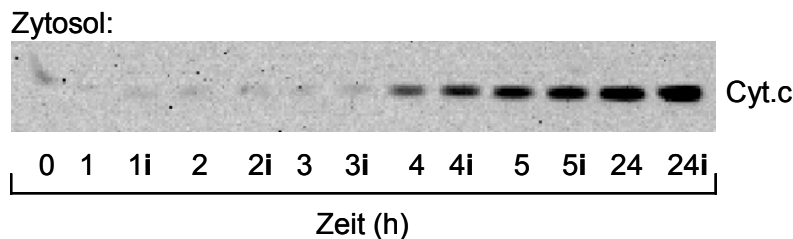


Abb. 36: Die Cytochrom c-Freisetzung erfolgt unabhängig von Caspasen. HL-60 Zellen 1 h mit Caspaseinhibitor z-VAD-fmk (i) vorinkubiert, anschließend mit Ajoen (20  $\mu$ M) für 0-24 h inkubiert. Zytosolische und mitochondriale Fraktionen bereitet wie in Material und Methoden beschrieben. Nachweis der zeitabhängigen Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol durch Western Blot.

Dieser Versuch zeigt: die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran erfolgt unabhängig von aktivierten Caspasen.

Die Mitochondrien werden im Verlauf der Ajoen-induzierten Apoptose angegriffen: Durch Permeabilisierung der inneren und der äußeren mitochondrialen Membran können sie ihre normale Funktion nicht mehr aufrechterhalten (mitochondriale Dysfunktion).

Im Folgenden beschäftigten wir uns mit der Frage, ob diese Dysfunktion für die Ajoen-vermittelte Apoptose erforderlich ist.

#### 3.2.3.4 Die Rolle der Mitochondrien im Ajoen-induzierten Signalweg

Wie in der Einleitung, Kapitel 1.3.2.3.2 beschrieben, kann ein Schutz vor Mitochondrien-abhängiger Apoptose durch die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie gewährleistet werden. Es gilt heute allgemein, dass die Überexpression dieser Proteine (z.B. Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>) die Freisetzung von Cytochrom c und so die Aktivierung von Caspasen „downstream“ der Mitochondrien verhindern kann<sup>24,54,137-140</sup>. Der Ansatz für die folgenden Experimente war folgende Überlegung: wenn Mitochondrien im Signaltransduktionsweg von Ajoen eine entscheidende Rolle spielen, so muss eine Überexpression von anti-apoptotisch wirkendem Protein Bcl-x<sub>L</sub> Apoptose verhindern können.

#### 3.2.3.4.1 Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub>

Für diese weiterführenden Experimente bedienten wir uns zweier stabil transfizierter Zelllinien: HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen, die ein Plasmid zur Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> (pSFFVneo-bcl-x<sub>L</sub>) enthalten und HL-60/neo Zellen, die nur den Vektor (pSFFV-neo) ohne die Information für das Bcl-x<sub>L</sub>-Protein besitzen (Kontrolle) (s.a. Material und Methoden 2.1.1). Als erstes überprüften wir die Überexpression per Western Blot: HL-60 und HL-60/neo Zellen besitzen kein Bcl-x<sub>L</sub>-Protein (29 kDa), während HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen das Bcl-x<sub>L</sub>-Protein exprimieren (Abb. 37).

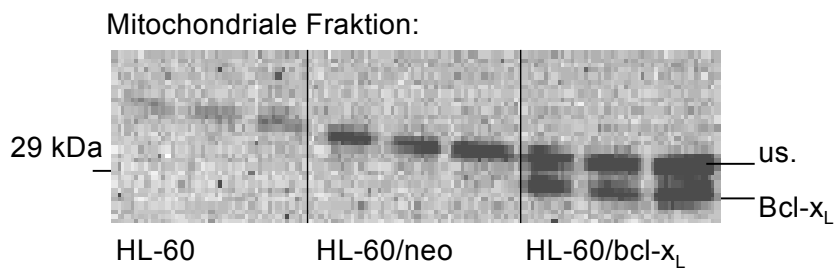


Abb. 37: Mitochondriale Expression von Bcl-x<sub>L</sub> in HL-60 Zellen, HL-60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen.

Der Nachweis von Bcl-x<sub>L</sub> erfolgte immunologisch (Western Blot) mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bcl-x<sub>L/S</sub> (us. = unspezifische Bande).

#### 3.2.3.4.2 Die Ajoen-induzierte Apoptose erfolgt Mitochondrien-kontrolliert

Nach Stimulation mit Ajoen (20 µM) bis 8 h wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen mit Hilfe der lebend/tot-Färbung mit Propidiumjodid ermittelt. HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen waren signifikant gegenüber Ajoen (20 µM, 0-8 h) geschützt. Als Kontrolle diente ein Versuch mit Etoposid<sup>54</sup> (E, 17 µM) (Abb. 38).

Studien in unserem Arbeitskreis ergaben weiter, dass die apoptotische Antwort in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen auf Ajoen (8 h, 24 h) auch bei höheren Ajoenkonzentrationen (10 bis 40 µM) signifikant erniedrigt ist (Abb. 38B). Zudem war die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Caspasen in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen abgeschwächt und zeitlich stark verzögert (Abb. 38C).

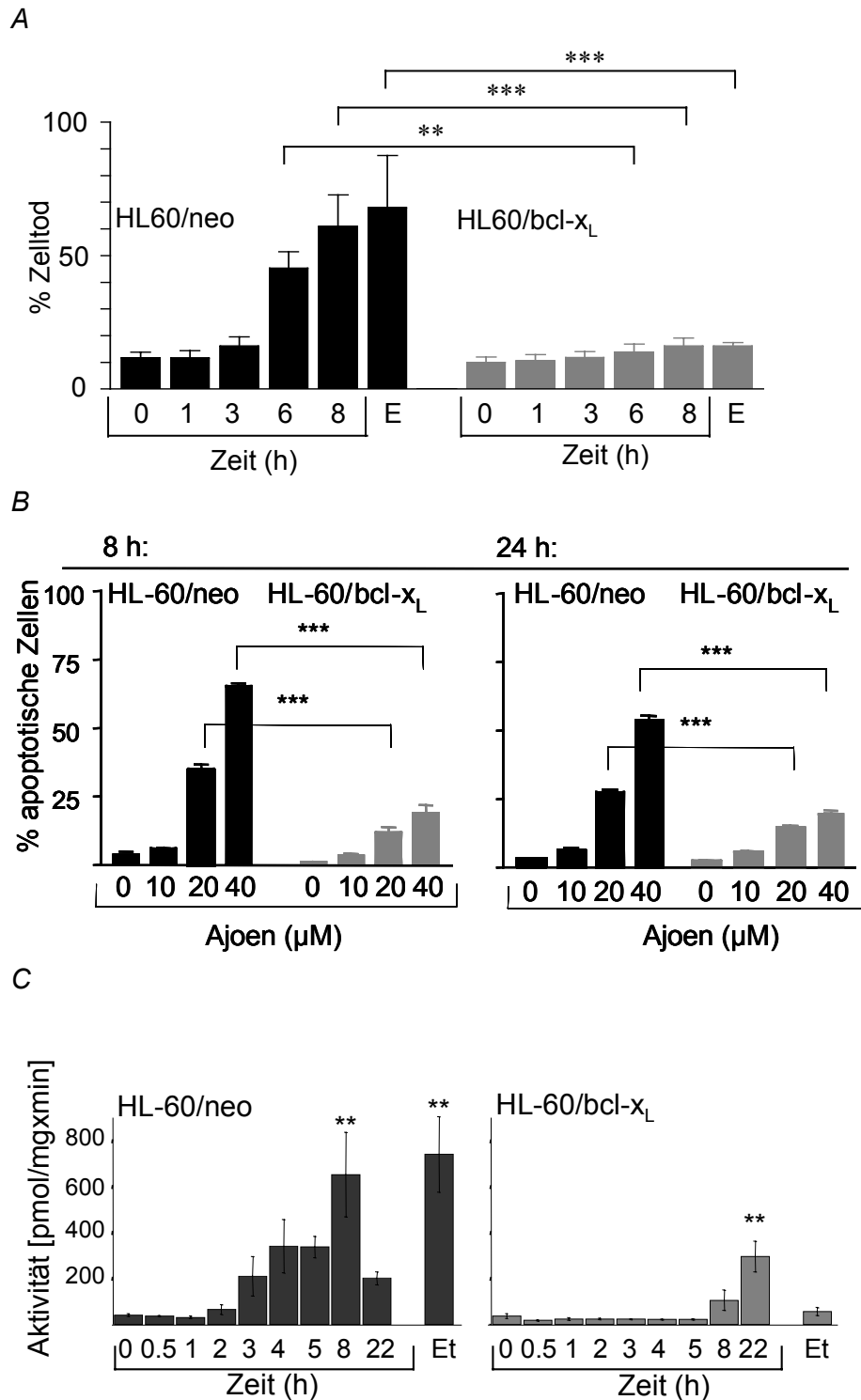


Abb. 38: Bcl-x<sub>L</sub> schützt vor Ajoen-induzierter Apoptose.

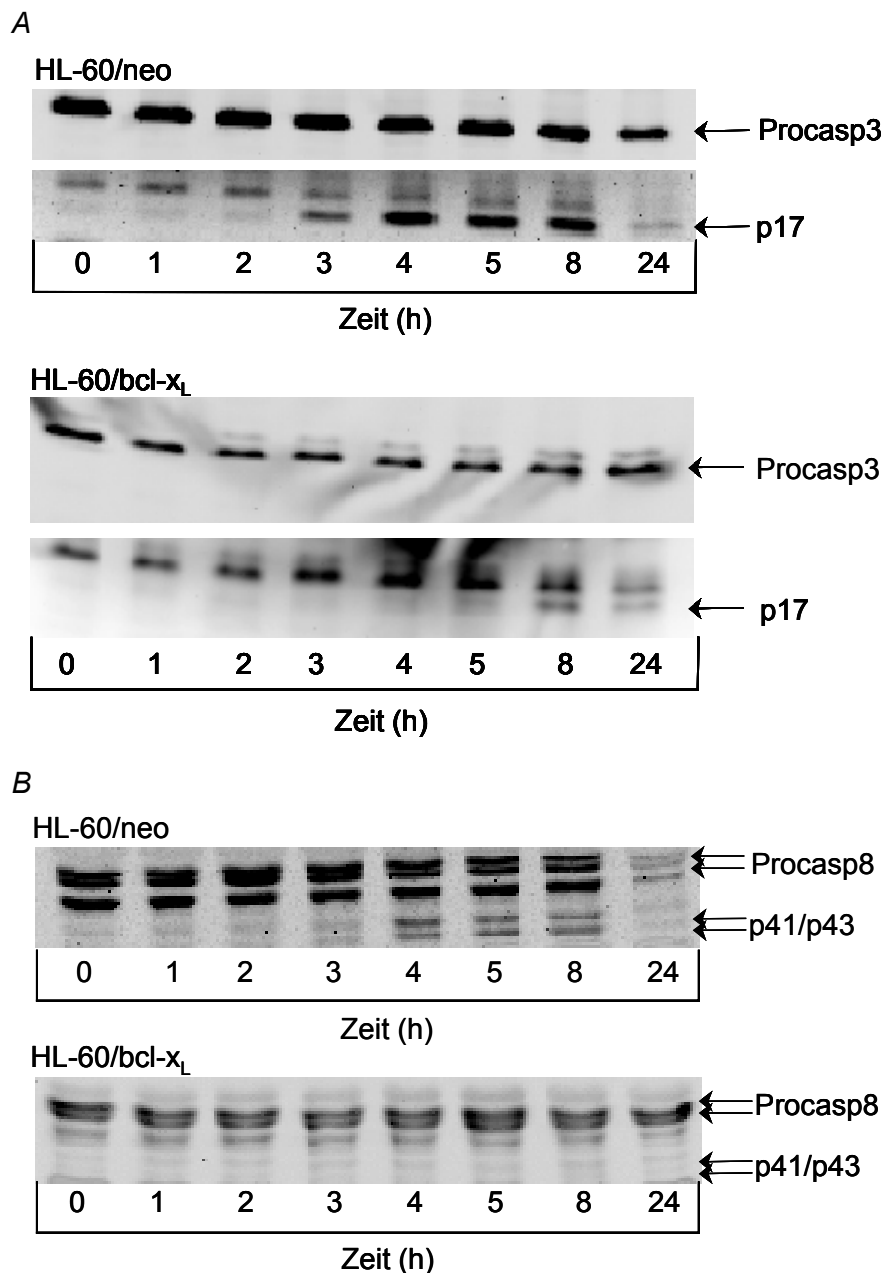
**A** Inkubation von HL-60/neo (schwarze Balken) und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> (graue Balken) mit Ajoen (20 µM) für 0-8 h. Positivkontrolle mit Etoposid (E, 17 µM, 8 h). Durchflusszytometrische Bestimmung des eintretenden Zelltodes nach Propidiumjodid-Färbung, Auswertung mittels CELLQuest Software. Zellen mit Propidiumjodidaufnahme sind als tot definiert. \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 (unpaired two tailed student's t-test). **B** Durch

*Ajoen-verursachte Apoptose (10-40  $\mu$ M) in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (graue Balken) war nach 8 (links) bzw. 24 h (rechts) im Vergleich zu HL-60/neo Zellen (schwarze Balken) signifikant reduziert (unpaired two tailed student's t-test). C Aktivitätsbestimmung der Caspase-3-ähnlichen Caspasen nach 0-22 h Ajoen-Exposition (20  $\mu$ M) mittels „DEVD-afc Spaltungs-Assays“. Die Aktivierung der Caspase-3-ähnlichen Caspasen erfolgte im Vergleich zu HL-60/neo Zellen (linkes Bild) abgeschwächt und verzögert in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (rechtes Bild). Etoposid (Et, 10  $\mu$ g/ml, 3 h) als Positivkontrolle. Mittelwerte  $\pm$  SEM dreier unabhängiger Experimente, in Dreifachbestimmung. \*\* $p < 0,01$  (ANOVA/Dunnett).*

Western Blot Analysen bestätigten diese Ergebnisse: das aktive Spaltprodukt (p17) der Caspase-3 konnte nur durch Auftragen hoher Proteinkonzentrationen (70  $\mu$ g) in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen nachgewiesen werden (Abb. 39A, untere Graphik). Im Gegensatz dazu war im Lysat der HL-60/neo Zellen das Spaltprodukt p17 schon nach 3-4 h Exposition detektierbar (aufgetragene Proteinkonzentration: 50  $\mu$ g) (Abb. 39A, obere Graphik).

In HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen war im Vergleich zu HL-60/neo Zellen keine Aktivierung der Caspase-8 detektierbar (Abb. 39B).





**Abb. 39:** Die Aktivierung der Caspase-3 und-8 erfolgt „downstream“ der mitochondrialen „Aktivierung“.

**A** Repräsentative Western Blots zeigen die zeitabhängige Spaltung der Caspase-3 in ihre Untereinheit p17 in HL-60/neo (A, oben) im Vergleich zu HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (A, unten) nach Ajoen-Gabe (20 μM, 0-24 h). **B** Aktivierung der Caspase-8 in HL-60/neo im Vergleich zu HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen und zeitabhängiges Auftreten der Spaltungszwischenprodukte p41/p43. Nachweis der aktiven Caspasen wie in Abb. 24 und Abb. 25.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen: Ajoen führt zu einer Mitochondrien-abhängigen Aktivierung der Caspasen. Ajoen induziert somit den programmierten Zelltod über den intrinsischen Signaltransduktionsweg.

Dieses Ergebnis wurde für eine weitere Zelllinie überprüft. Dazu untersuchten wir die apoptotische Antwort von Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Jurkat Zellen nach Ajoen-(20 µM) Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen (Jurkat/neo, s.a. 2.1.1). Das Resultat ist in Abb. 40 dargestellt: die Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> schützte auch Jurkat Zellen vor dem Ajoen-provozierten apoptotischen Zelltod.

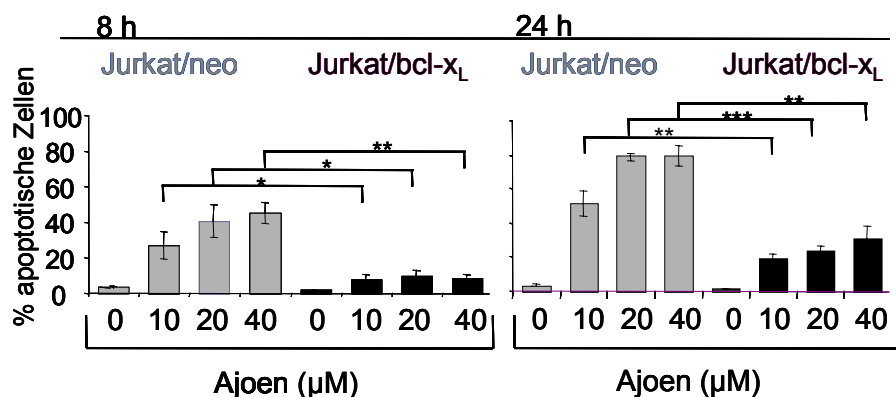


Abb. 40: Der Schutz durch Bcl-x<sub>L</sub> ist kein zelltypabhängiges Phänomen. Ajoen induzierte in Jurkat/neo zeit- (8 h, 24 h) und konzentrationsabhängig (10-40 µM) Apoptose (graue Balken). In Jurkat/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (schwarze Balken) war ein signifikanter Schutz im Vergleich zu Jurkat/neo Zellen nachweisbar. Nach Ajoen-Stimulation und Propidiumjodid-Färbung wurden die sub-diploiden Kerne durchflusszytometrisch bestimmt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (unpaired two tailed student's t-test).

Als ein zusätzlicher Beweis für einen intrinsisch verlaufenden Signalweg auch in Jurkat Zellen ist das Ergebnis aus den Untersuchungen zum CD95-Rezeptor zu sehen. Jurkat<sup>R</sup> Zellen, die den CD95-Rezeptor nicht besitzen, sterben nach Ajoen-Exposition im selben Ausmaß wie die entsprechenden Kontrollzellen (Abb. 30, Kapitel 3.2.2.2.3).

### 3.2.3.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von HL60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen

Zellen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, sind vor Ajoen-induzierter Apoptose geschützt. Forschungsziel war, die möglichen intrazellulären, morphologisch sichtbaren Unterschiede von HL-60/bcl-x<sub>L</sub> im Vergleich zu Kontrollzellen (HL-60/neo) zu untersuchen. Dazu wurden Ultradünnschnitte transmissions-elektronenmikroskopisch (TEM) untersucht. Die beiden Zelllinien wurden für 3 h mit Ajoen (20 µM) inkubiert, anschließend für die TEM fixiert. Die weiteren Vorbereitungen und die Aufnahmen erfolgten

freundlicherweise im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Wanner am Botanischen Institut (s.a. Material und Methoden 2.3.3).

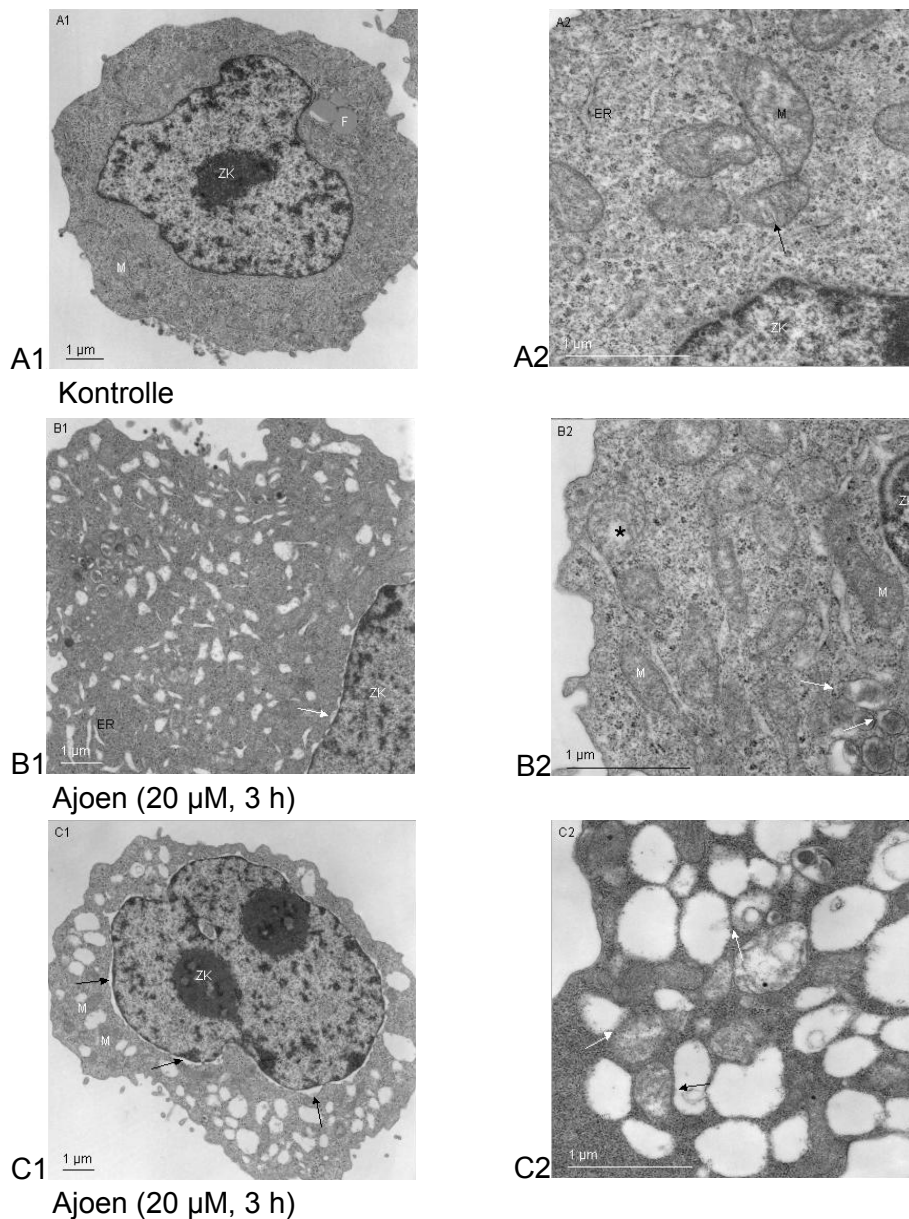
#### 3.2.3.5.1 Morphologische Unterschiede vor und nach Stimulation

Die Untersuchungen von HL-60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> zeigen klar morphologische Unterschiede vor und nach Ajoen-Stimulation (Abb. 41 bzw. Abb. 42). In den Ultradünnschnitten (ca. 7 nm Schichtdicke) nicht-stimulierter HL-60/neo Zellen erscheint charakteristischerweise das Zytoplasma relativ elektronendicht und die mitochondrialen Membranen haben einen guten Kontrast. Die Untersuchungen zeigen, dass die Kernmembran ebenfalls deutlich kontrastiert ist. In den Zellen treten regelmäßig einzelne Lipidkörperchen auf.

Stimulierte HL-60/neo Zellen (Ajoen 20 µM, 3 h) lassen eine Schwellung des Lumens des Endoplasmatischen Retikulums (ER) deutlich erkennen. Ebenso ist eine Dilatation des Lumens der Kernhülle auffällig (Abb. 41B1). Zusätzlich schwillt die Matrix der Mitochondrien an, diese werden dadurch elektronentransparenter (Abb. 41B2). Charakteristisch ist das Auftreten zahlreicher Vesikel (Abb. 41C1), die Kernmembran dilatiert noch stärker. Besonders auffällig erscheint die Ko-Lokalisation der Mitochondrien mit Vesikeln (Abb. 41C2).

In unstimulierten HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (Abb. 42A) erscheint das Zytoplasma elektronendicht, jedoch ist im Gegensatz zu HL-60/neo (Übersichtsaufnahme Abb. 41A1) der Membrankontrast wesentlich geringer. In Abb. 42A2 ist eine Detailaufnahme der Mitochondrien abgebildet. Sie belegt den wesentlich schwächeren Kontrast der mitochondrialen Membranen im Vergleich zum Kern.

In stimulierten HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen erscheinen die Mitochondrienmembranen mit einem stärkeren Kontrast verglichen mit der Kontrolle (Abb. 42B1). Das ER-Lumen ist angeschwollen. Die Detailaufnahme (Abb. 42B2) belegt eine leichte Schwellung im Lumen der inneren und äußeren Kernmembran, eine Schwellung im ER und eine Schwellung in der mitochondrialen Matrix.



**Abb. 41:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten (ca. 7 nm Schichtdicke) von HL-60/neo Zellen.

**A1** Nicht stimulierte HL-60/neo (Kontrolle). Die Zellen zeigen ein relativ elektronendichtes Zytoplasma mit typischen Mitochondrien (ZK: Zellkern; F: Lipidkörperchen, M: Mitochondrium). **A2** Detailaufnahme typischer Mitochondrien. Deutlich sind die Cristae erkennbar (Pfeil). **B1** Stimulierte HL-60/neo Zellen (Ajoen 20 µM, 3 h). Auffällig ist die Schwellung des Lumens des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und die Schwellung des Lumens zwischen innerer und äußerer Kernmembran (Pfeil). **B2** Auftretende Schwellung der Matrix in den Mitochondrien (Pfeile) nach Stimulation. **C1** Charakteristisch für spätere Stadien sind zahlreiche elektronentransparente Vesikel. Die Kernmembran löst sich stark ab (Pfeile). **C2** Auffällige Ko-Lokalisation der Mitochondrien mit Vesikeln (Pfeile). Vergrößerung der Abbildung siehe Anhang 4A-4C.

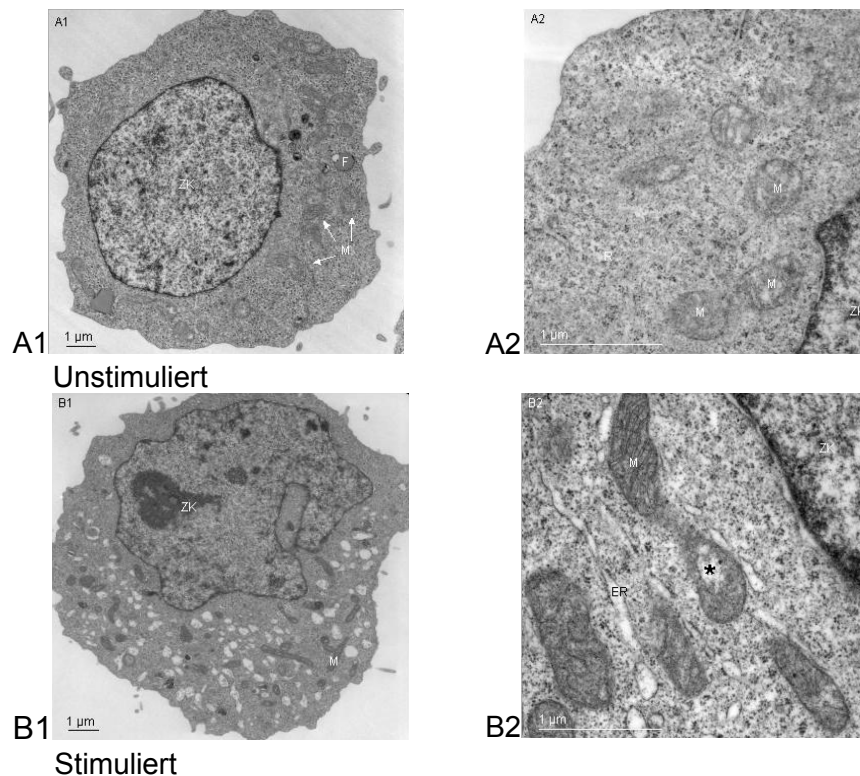


Abb. 42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten von HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen.

**A1** HL-60/bcl-x<sub>L</sub> unstimuliert (Kontrolle). Das Zytoplasma erscheint elektronendicht (ZK: Zellkern; F: Lipidkörperchen; M: Mitochondrium). **A2** Nicht-stimuliert, Detailaufnahme; die Membran der Mitochondrien weist im Vergleich zu HL-60/neo (s. Abb. 41A1) einen schwächeren Kontrast auf. **B1** Der Kontrast der mitochondrialen Membranen nimmt nach Stimulation mit Ajoen (20 µM, 3 h) zu; eine Schwellung des ER-Lumens ist charakteristisch. **B2** Die Mitochondrien zeigen nach Stimulation eine geschwollene Matrix (\*) dadurch elektronentransparenter; Schwellung des ER-Lumens. Vergrößerung der Abbildungen siehe Anhang 4D-4E.

### 3.2.3.5.2 Statistische Auswertungen struktureller Veränderungen

Die auffälligen Veränderungen der Mitochondrien sollten durch eine (einfache) statistische Auswertung untermauert werden.

Zunächst wurde der Anteil degenerierter Mitochondrien in den Ultradünnschnitten untersucht. Die Analyse des prozentualen Anteils degenerierter Mitochondrien pro Zytoplasmaflächeneinheit ergab einen erhöhten Anteil degenerierter Mitochondrien in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (Abb. 43A). Nach Stimulation mit Ajoen (20 µM) nahmen die Mitochondrienvolumina in HL-60/neo Zellen tendenziell ab. Ebenso verringerten sich die Mitochondrienvolumina in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (Abb. 43B).

Untersuchungen zum relativen Volumenanteil der Vesikel/ Flächeneinheit des Zytoplasmas vor und nach Stimulation mit Ajoen in HL-60/neo und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen, ergab eine extrem verstärkte Vesikelbildung in HL-60/neo Zellen (Abb. 43C).

Die Bewertung dieser Befunde erfolgt in der Diskussion.

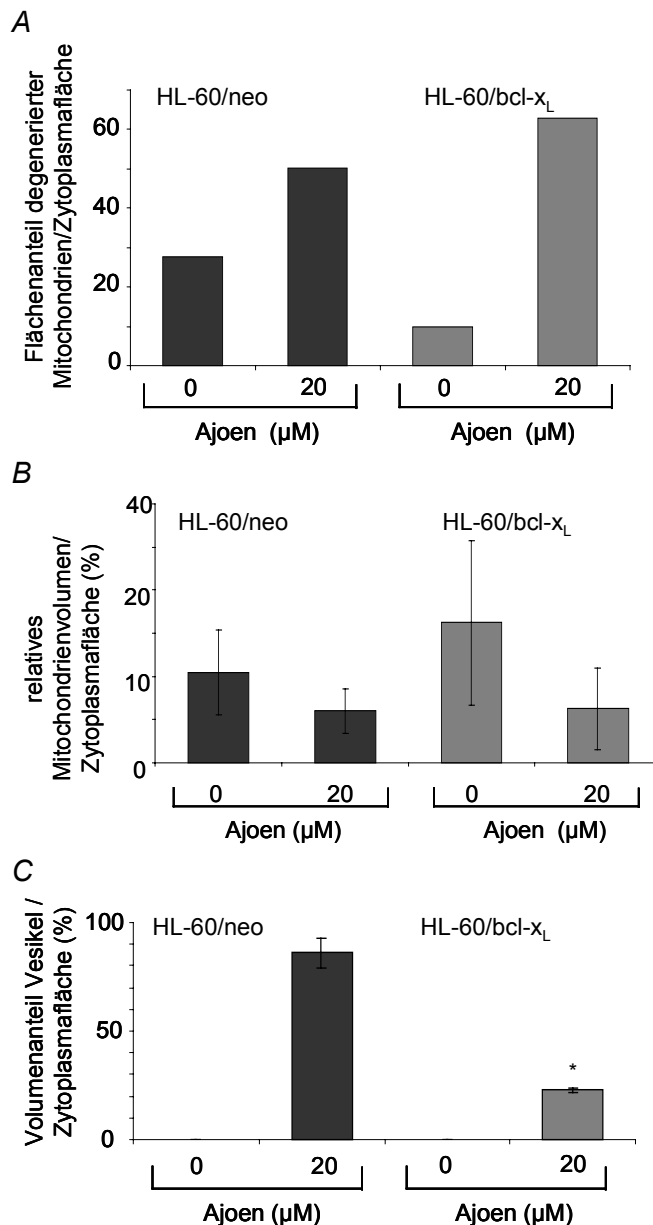


Abb. 43: Statistische Auswertung der morphologischen Untersuchungen.

**A** Bestimmung des prozentualen Anteils degenerierter Mitochondrien in HL-60/neo (schwarze Balken) und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (graue Balken). Dabei ist der Anteil degenerierter Mitochondrien prozentual auf die Gesamtzahl der Mitochondrien pro Zytoplasmafläche bezogen. **B** Bestimmung des durchschnittlichen relativen Volumens (pro Zytoplasmafläche) von HL-60/neo (schwarze Balken) und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (graue Balken) nach Ajoen-Stimulation (20 μM, 3 h). **C** Bestimmung des relativen Volumenanteils der Vesikel/Zytoplasma in HL-60/neo

(dunkle Balken) im Vergleich zu HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (graue Balken). Eine signifikante Reduktion des Volumenanteils der Vesikel war in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen detektierbar. \* $p < 0,05$  (student's t-test).

### 3.2.3.5.3 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Ajoen induziert Apoptose nicht über den extrinsischen, CD95-Rezeptor/CD95L-vermittelten Signaltransduktionsweg, sondern über einen Mitochondrien-kontrollierten „Pathway“ (intrinsisch). Dabei kommt es nach Verlust des elektrochemischen Gradienten der inneren mitochondrialen Membran und nach Cytochrom c-Freisetzung (Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran) zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 und der Caspase-8, die schließlich über weitere Mediatoren den Zelltod vermitteln. Der Signalweg ist Mitochondrien-kontrolliert, da anti-apoptotisch wirkende Proteine, wie z.B. Bcl-x<sub>L</sub> den apoptotischen Zelltod verhindern können (Abb. 44) (vergleiche auch Einleitung 1.3.2.3).

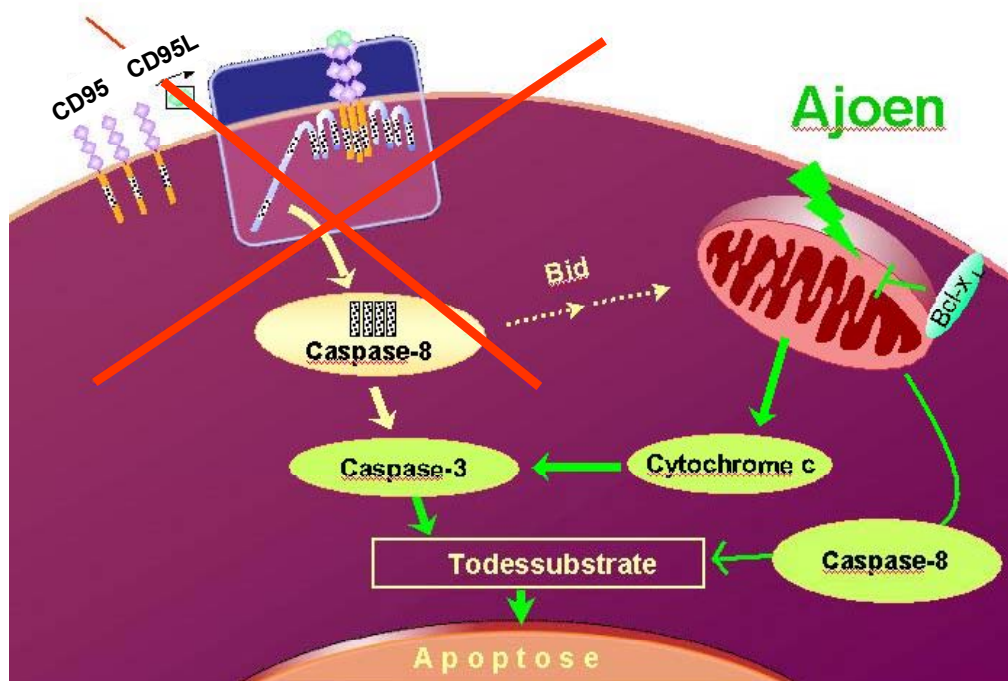


Abb. 44: Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse.

Im weiteren sollten mögliche Mechanismen, die zur Aktivierung des intrinsischen Signaltransduktionsweges führen, identifiziert werden.

### 3.2.4 Potentielle Mediatoren der mitochondrial vermittelten Signaltransduktion

#### 3.2.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Ein Mechanismus, über den zytotoxische Substanzen Apoptose induzieren können, verläuft über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies wurde meist für  $H_2O_2$ , einem typischen Marker für die Generierung von ROS, untersucht<sup>61</sup> (siehe 1.4.1.1).

##### 3.2.4.1.1 Ajoen induziert zeitabhängig die Bildung von ROS

Um eine intrazelluläre Entstehung von Wasserstoffperoxid nachweisen zu können, bedienten wir uns des redoxsensitiven Farbstoffes DHR-123 und der Durchflusszytometrie. DHR-123 wird durch Wasserstoffperoxid zu fluoreszierendem Rhodamin oxidiert, welches im FACS erfasst werden kann. Die Behandlung von HL-60 Zellen mit Ajoen (20  $\mu M$ ) für 0-60 min führte innerhalb 5-15 min zu einer schnellen ROS-Produktion, die nach 30 min signifikant war.

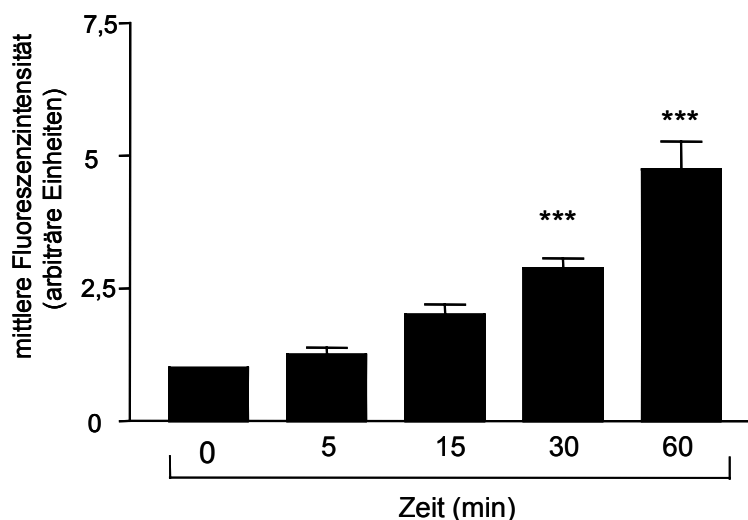


Abb. 45: Zeitabhängige Erhöhung der Peroxidbildung durch Ajoen in HL-60 Zellen. Zellen mit DHR-123 beladen, mit Ajoen (20  $\mu M$ ) behandelt. Messung der intrazellulären Peroxidentstehung (mittlere Fluoreszenzintensität (FL-1)). Mittelwerte  $\pm$  SEM dreier unabhängiger Experimente, durchgeführt jeweils als Dreifachbestimmung, . \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Dunnett).



### 3.2.4.1.2 Die ROS-Bildung ist ein konzentrationsabhängiger Prozess

Dirsch et al.<sup>5</sup> zeigten die Abhängigkeit der ROS-Bildung von der eingesetzten Ajoen-Konzentration. HL-60 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Ajoen (0-20  $\mu\text{M}$ ) behandelt und die Generierung von ROS nach 15 min im FACS bestimmt (Abb. 46). Ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte ein signifikanter Anstieg beobachtet werden:

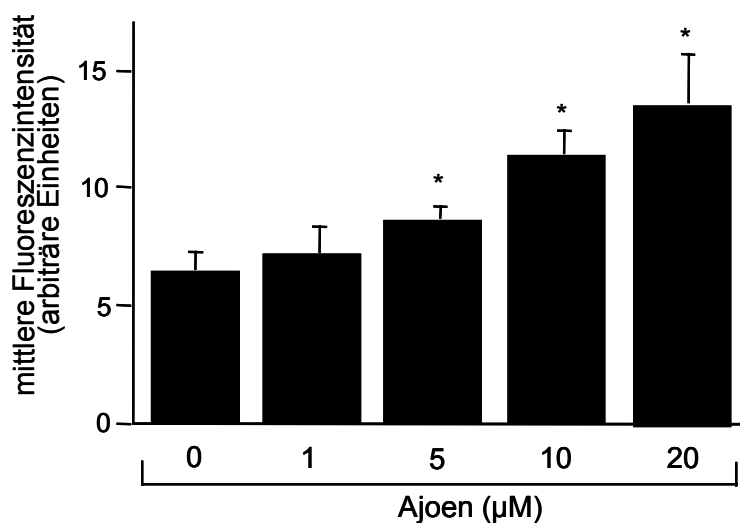
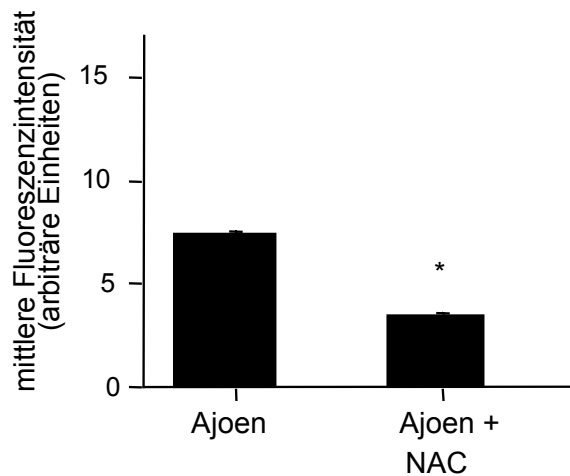


Abb. 46: Ajoen induziert konzentrationsabhängig die Bildung von ROS (aus Dirsch et al., 1998<sup>5</sup>).

HL-60 Zellen, mit DHR-123 beladen, behandelt mit steigenden Ajoenkonzentrationen 0-20  $\mu\text{M}$ . Nach 15 min Inkubation, Bestimmung der Peroxidbildung mittels FACS. Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier Experimenten, durchgeführt als Dreifachbestimmung. \* $p < 0,01$  (t-test).

### 3.2.4.1.3 ROS sind wichtige Mediatoren in der Ajoen-induzierten Apoptose

Eine Vorinkubation der Zellen mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) hemmte sowohl die ROS-Produktion (Abb. 47) als auch die Apoptoserate in den HL-60 Zellen signifikant<sup>5</sup>. Ajoen induziert Apoptose folglich über reaktive Sauerstoffspezies.



*Abb. 47: NAC verhindert die Ajoen-induzierte ROS-Bildung. Relative Menge an Peroxid in HL-60 Zellen, nur mit Ajoen (10  $\mu$ M, 20 min) oder mit NAC (15 mM, 3 h) vorbehandelt, dann mit Ajoen (10  $\mu$ M, 20 min) stimuliert. NAC alleine hatte keinen Einfluss auf die Peroxidproduktion (Daten nicht gezeigt). Das Balkendiagramm gibt die relativen FL-1 Fluoreszenzintensitäten wieder. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Experimenten (in Dreifachmessung). \* $p < 0,01$  (aus Dirsch et al., 1998<sup>5</sup>).*

ROS sind also wichtige Mediatoren in der Ajoen-induzierten Apoptose.

Zunächst war die Herkunft der ROS zu untersuchen. Mitochondrien sind aufgrund ihrer Funktion und Enzymausstattung eine der Hauptquellen für die Erzeugung von oxidativem Stress<sup>60</sup> (s.a. Einleitung 1.4.1.1). Stammen die gebildeten ROS aus den Mitochondrien, so sollten spezifische, an den Mitochondrien angreifende Inhibitoren der ROS-Freisetzung, diese nach Ajoen-Exposition unterbinden können.

#### 3.2.4.1.4 Lokalisation der Entstehung von ROS

##### 3.2.4.1.4.1 Versuche mit Bongkreikic-Säure und Rotenon

Die Vorinkubation mit Bongkreikic-Säure, einer Verbindung, die den ANT (Adenin-Nukleotid-Translokator) (s. Einleitung 1.3.2.2) hemmt und dadurch die Porenöffnung an der inneren mitochondrialen Membran verhindert, soll dem Abfall des elektrochemischen Gradienten entgegenwirken. Weiterhin kann durch Vorinkubation mit Rotenon in einem weiteren Experiment die Atmungskette inhibiert und so die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien unterbunden werden. Auf diese Weise eruierten wir, ob die durch Ajoen hervorgerufenen ROS aus den Mitochondrien stammen.

In der Abb. 48 ist das Ergebnis der Untersuchungen zur ROS-Erzeugung durch Ajoen (20  $\mu$ M) dargestellt. HL-60 Zellen wurden mit Rotenon (Ro) und Bongkreikic-Säure (BA) 1 h vorinkubiert und anschließend mit Ajoen (20  $\mu$ M) stimuliert. Ro und BA alleine appliziert induzierten keine Bildung von ROS. Weder Bongkreikic-Säure noch Rotenon konnten die durch Ajoen verursachte Entstehung von ROS verhindern:

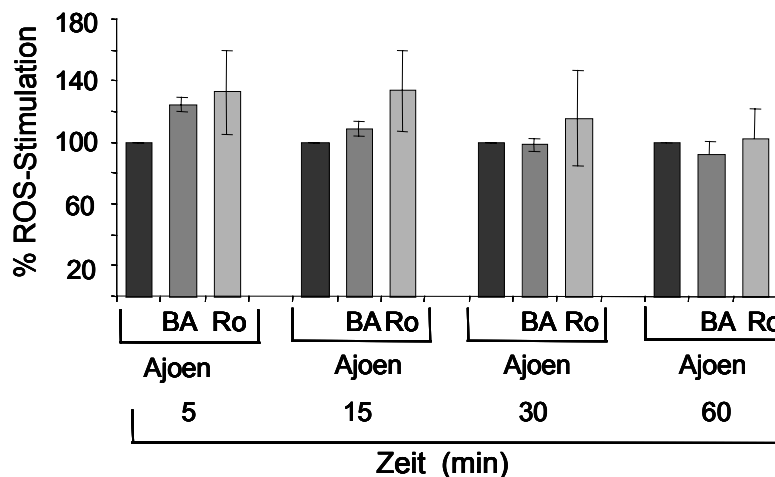


Abb. 48: Mitochondrien scheiden als Quelle der ROS aus.

HL-60 Zellen, mit Bongkreikic-Säure (BA, 50  $\mu$ M) oder Rotenon (Ro, 5  $\mu$ M) 1 h vorinkubiert. Nach Beladung mit DHR-123 Stimulation für 0-60 min mit Ajoen (20  $\mu$ M), dann Verfolgung der ROS-Bildung am Durchflusszytometer. BA und Ro induzierten keine ROS-Generierung. Die Werte sind ausgedrückt in Prozent der maximalen Ajoen-Stimulation. Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachmessung.

Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies stammen offensichtlich nicht aus den Mitochondrien. Diese Annahme wurde durch einen weiteren experimentellen Ansatz überprüft:

#### 3.2.4.1.4.2 Untersuchungen zur ROS-Generierung in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen

Werden ROS im Verlauf der mitochondrialen „Aktivierung“ freigesetzt, so müsste in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen die ROS-Produktion unterbunden oder zumindest gedrosselt sein. HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen wurden mit Ajoen stimuliert und die ROS-Generierung im FACS im Vergleich zu HL-60/neo Zellen verfolgt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der ROS-Bildung zwischen geschützten HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen und den Kontrollzellen (HL-60/neo) detektiert werden (Abb. 49).

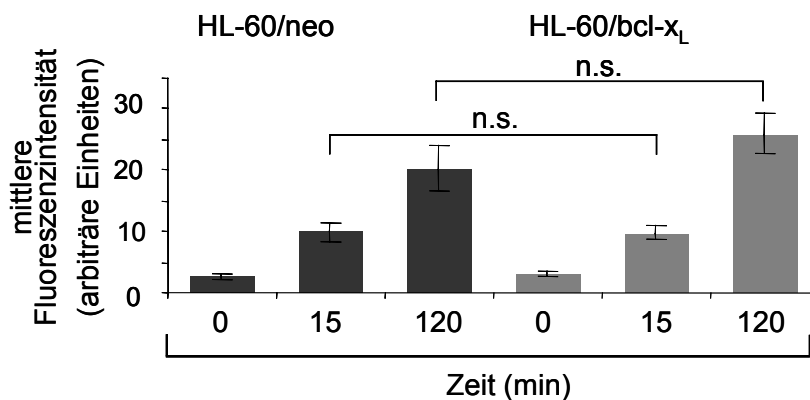


Abb. 49: ROS-Bildung in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen nach Ajoen-Stimulation. Detektion der zeitabhängigen ROS-Entstehung in HL-60/neo Zellen (schwarze Balken) im Vergleich zu HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen (graue Balken). Zellen mit Ajoen (20 µM) behandelt, Messung der ROS-Bildung mittels DHR-123. Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (in Dreifachbestimmung). n.s. = nicht signifikant (student's t-test).

Die Ergebnisse der Versuche mit BA, Ro und der HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zelllinie stützen die Annahme, dass die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies nach Ajoen-Stimulation nicht den Mitochondrien entstammen. Die ROS sind also in der Hierarchie der Signalkaskade „upstream“ oder unabhängig von den Mitochondrien einzuordnen. Dies wurde durch das folgende Experiment bestätigt.

#### 3.2.4.1.5 NAC unterdrückt die Aktivierung der Caspase-3

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt, wie unter Kapitel 3.2.3.4.2 gezeigt, „downstream“ der Mitochondrien. Falls ROS „upstream“ der Mitochondrien und somit vor der Caspaseaktivierung agieren, müsste das Antioxidans NAC die Aktivierung der Caspasen hemmen können.

HL-60 Zellen wurden mit NAC (15 mM) 3 h lang vorinkubiert und anschließend mit Ajoen (20 µM) behandelt. Die Aktivierung der Caspase-3 wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 50):

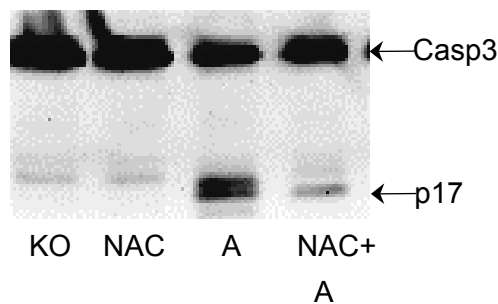


Abb. 50: Die Ajoen-induzierte ROS-Entstehung liegt „upstream“ der Mitochondrien-abhängigen Caspaseaktivierung.

Western Blot der Caspase-3 Aktivierung: Zellen unbehandelt (KO) oder nur mit NAC (15 mM) oder nur mit Ajoen (A, 20  $\mu$ M, 6 h) behandelt, oder 3 h mit NAC (15 mM) vorinkubiert und anschließend mit Ajoen (A, 20  $\mu$ M, 6h) stimuliert. Die Detektion des aktiven Spaltprodukts p17 der Caspase-3 erfolgte wie in Abb. 24 beschrieben.

NAC unterbindet die Caspase-3 Aktivierung. Dies beweist nochmals, dass ROS zur Apoptoseinduktion notwendig sind. Zudem weist das Ergebnis darauf hin (vergleiche Ergebnisse Kapitel 3.2.4.1.4.1 und 3.2.4.1.4.2), dass die ROS-Entstehung ein Ereignis vor der mitochondrialen „Aktivierung“ sein könnte. Dieses Resultat führt zur Fragestellung, welche Signaltransduktionswege zwischen ROS und Mitochondrien liegen.

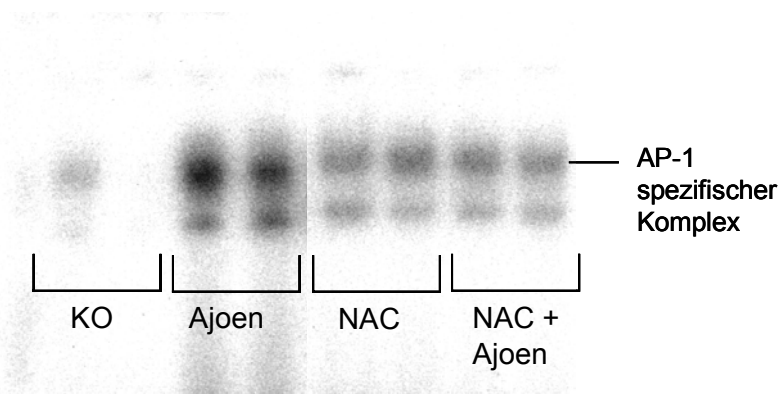
#### 3.2.4.2 Involvierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen

Reaktive Sauerstoffspezies sind u.a. Mediatoren für die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Diese spielen in vielen zellulären Programmen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellbewegung, aber auch beim Zelltod eine wichtige Rolle<sup>73-77,141</sup>. Verschiedene Arbeiten zeigten eine Erhöhung des ROS-Levels in leukämischen Zellen, die zur Aktivierung der MAPK und zum apoptotischen Zelltod führen<sup>57,70-72</sup>. Dabei scheint der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1), der von MAPK reguliert wird<sup>68</sup>, eine wichtige Stellung in der Signalvermittlung einzunehmen (s.a. Einleitung 1.4). Zunächst untersuchten wir, ob Ajoen die Aktivierung von AP-1 induziert.

##### 3.2.4.2.1 Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1

Nach Ajoen-Stimulation (10  $\mu$ M, 1 h) und Nucleipräparation konnten wir eine erhöhte Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an DNA im Elektrophoretic-Mobility-Shift Assay (EMSA) nachweisen. Ein kausaler Zusammenhang der AP-1 Aktivierung durch ROS konnte durch Einsatz des Antioxidans NAC (15

mM, 3 h) bestätigt werden: NAC hemmt die Aktivierung von AP-1 (Abb. 51). Die EMSA-Experimente wurden freundlicherweise von Fr. B. Weiss durchgeführt.



*Abb. 51: Ajoen induziert die Aktivierung von AP-1, NAC verhindert die Aktivierung. Das Antioxidans NAC (15 mM, 3 h vorinkubiert) hemmt die AP-1 Aktivierung durch Ajoen (10  $\mu$ M, 1 h). Nuclei-Präparation und Shift wie beschrieben. KO= Kontrolle.*

Der Transkriptionsfaktor AP-1 steht folglich mit den gebildeten ROS und der Induktion der Apoptose durch Ajoen (s.a. Kapitel 3.2.4.1.3) in direktem kausalen Zusammenhang.

### 3.2.4.2.2 Untersuchungen zur Aktivierung von MAPK

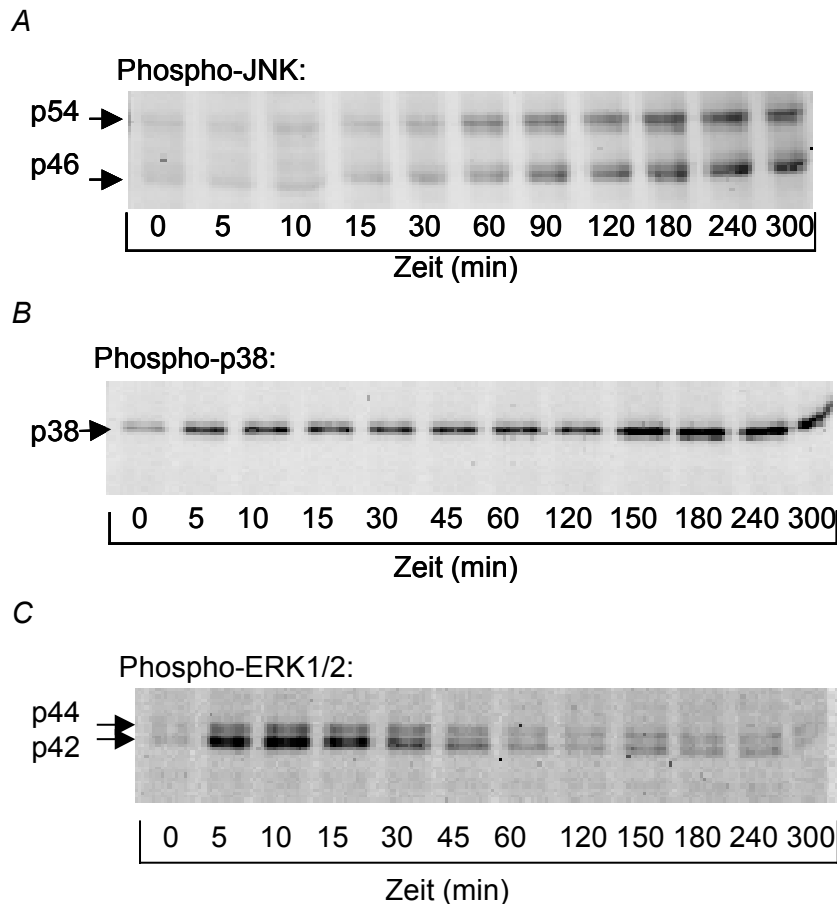
Die Aktivierung von AP-1 wird durch MAPK vermittelt (s.a. Einleitung 1.4.1.2). Die Frage war nun, ob Ajoen den MAPK-Signalweg „anschaltet“. Die Untersuchung erfolgte mittels Western Blot. Dabei kamen spezifische Antikörper gegen die aktivierte (= phosphorylierte) Form der MAPK zum Einsatz:

#### 3.2.4.2.2.1 Aktivierung der JNK, p38 MAPK und der ERK1/2

Nach Zugabe von Ajoen (20  $\mu$ M) zu HL-60 Zellen kommt es zur zeitabhängigen Aktivierung der Jun-Kinase 1 und 2 (JNK1, JNK2). Die Aktivierung ist nach ca. 60 min detektierbar und steigt bis 300 min an (Abb. 52A).

Auch erfolgte der Nachweis der Aktivierung der p38 MAPK (Abb. 52B). Die phosphorylierte, aktive Form konnte bereits 5 min nach Ajoen-Exposition immunologisch detektiert werden und hält über den gezeigten Zeitraum (300 min) an.

Ajoen aktivierte die ERK1/2 Kinase innerhalb kurzer Zeit (5 min) (Abb. 52C). Diese war allerdings nur transient (5-30 min). Das Ergebnis der Aktivierung scheint insofern interessant, da die ERK1/2 Kinasen vor allem in der Proliferation eine Rolle spielen.



**Abb. 52:** Ajoen induziert die Aktivierung der MAPK JNK, p38 und ERK1/2. Zeitabhängige Phosphorylierung von JNK (A), p38 (B) und ERK1/2 (C) durch Ajoen (20  $\mu$ M). Einsatz von 40  $\mu$ g Protein/Spur auf ein 7,5 % Gel (A-C) und elektrophoretische Auftrennung. Detektion der JNK, p38 und ERK1/2 Phosphorylierung mittels spezifischer Antikörper gegen phospho-JNK (JNK2 bei 54 kDa, JNK1 bei 46 kDa), phospho-p38 (38 kDa) und phospho-ERK1/2 (44 und 42 kDa).

Ajoen führt zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK, p38 und ERK1/2. Als nächstes war die Frage zu beantworten: Welche Bedeutung haben die MAPK in der Ajoen-induzierten Apoptose? Erste Experimente sollten Fragen zur Involvierung der JNK (auch SAPK, Stress-aktivierte Proteinkinase) beantworten:

### 3.2.4.2.3 Untersuchungen zur Aktivierung der JNK

Die JNK spielt in der durch Mitochondrien-vermittelten Signalvermittlung eine wichtigen Part. Viele Berichte sprechen von einer positiven Kausalität zwischen der Aktivierung der JNK durch z.B. UV-Bestrahlung<sup>142-145</sup> oder zytotoxische Substanzen<sup>69,146,147</sup> und der Apoptoseinduktion.

#### 3.2.4.2.3.1 JNK-Aktivierung „upstream“ oder „downstream“ der mitochondrialen Ereignisse?

Ajoen führt innerhalb von 4 h zu einer mitochondrialen Dysfunktion, eine Zeitspanne, die mit der Aktivierung der JNK zusammenfällt. Experimente mit HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen sollten Aufschluss darüber geben, ob die JNK-Aktivierung ein Mitochondrien-abhängiges Ereignis ist. Dazu wurde die Aktivierung von JNK in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen untersucht: die Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung der JNK (Abb. 53A). Diese erfolgt also in der Signalkaskade unabhängig von den Mitochondrien.

Der Einsatz des Breitbandcaspaseinhibitors z-VAD-fmk zeigte die Aktivierung der JNK auch unabhängig von der Aktivierung der Caspasen: HL-60 Zellen wurden mit z-VAD-fmk (100 µM) 1 h vorinkubiert, dann mit Ajoen (20 µM) stimuliert (0-240 min). Mittels Western Blot erfolgte der Nachweis der Aktivierung der JNK. Der Inhibitor verhinderte zwar die Apoptose durch Ajoen (s.a. Abb. 23), hatte aber keinen Einfluss auf die Aktivierung der JNK (Abb. 53B).



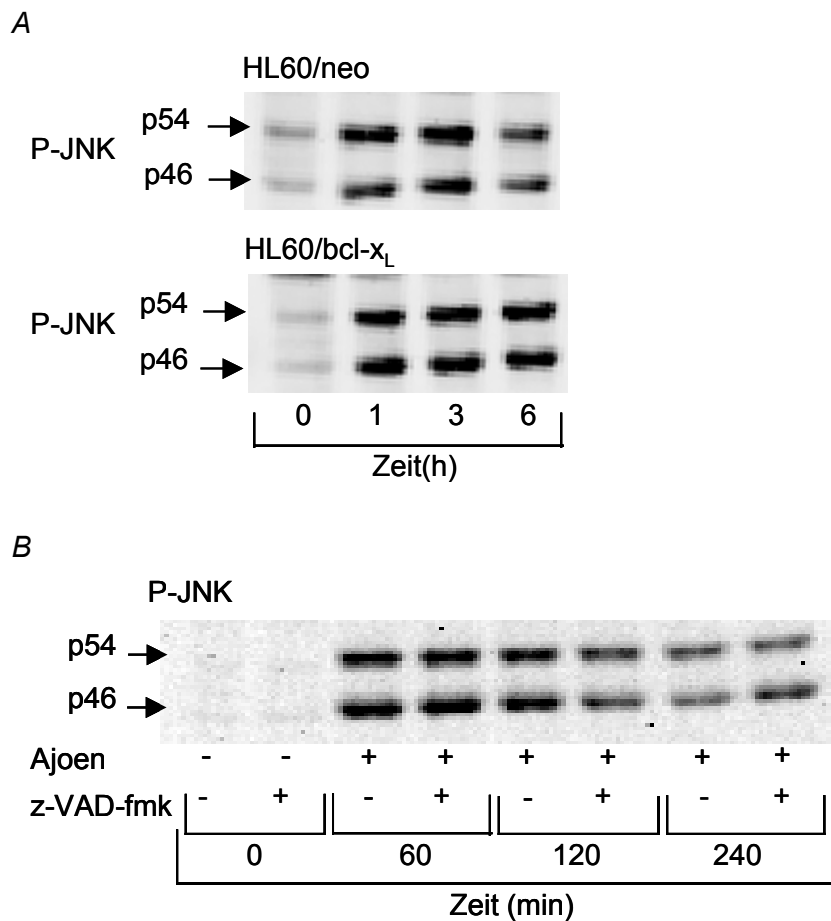
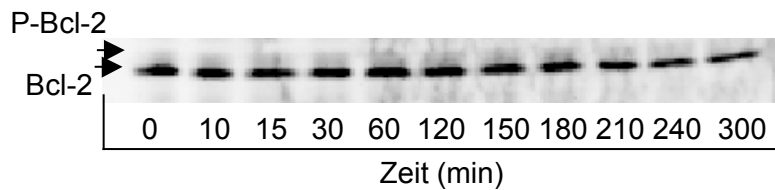


Abb. 53: Die JNK-Aktivierung erfolgt unabhängig von der mitochondrialen „Aktivierung“ und unabhängig von aktivierten Caspasen.

**A** Zeitabhängige Aktivierung von JNK in HL-60/neo als auch in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen durch Ajoen (20 μM, 0-6 h). **B** Die JNK-Aktivierung erfolgt unabhängig von aktiven Caspasen. HL-60 Zellen, mit Caspaseinhibitor z-VAD-fmk (100 μM) 1 h vorinkubiert, anschließend mit Ajoen (20 μM) behandelt (1-4 h). Nachweis der JNK-Aktivierung per Western Blot.

Die Aktivierung von JNK ist ein Ereignis, das in der Signaltransduktion unabhängig von der mitochondrialen „Aktivierung“ und unabhängig von der Aktivität der Caspasen erfolgt. Die Ergebnisse wären im Einklang mit einer möglichen Aktivierung der JNK „upstream“ der Mitochondrien. Eine pro-apoptotische Wirkung der JNK „upstream“ der mitochondrialen Ereignisse ist z.B. die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteins<sup>55,56,148</sup>. In unserem System konnte keine Phosphorylierung und dadurch keine Inaktivierung des Bcl-2-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 54), insofern ist dieser Ansatzpunkt einer möglichen pro-apoptotischen Funktion von JNK ausgeschlossen.

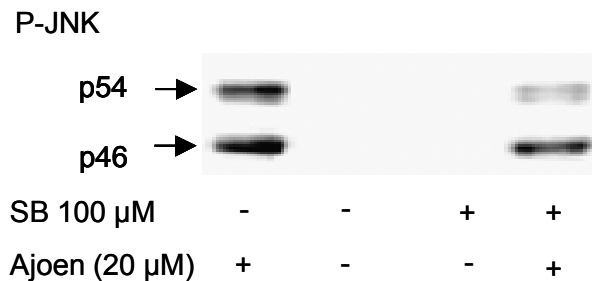


*Abb. 54: Ajoen induziert nicht die Phosphorylierung von Bcl-2. Inkubation von HL-60 Zellen mit Ajoen (20  $\mu$ M). Auftrennung des Proteins über SDS-PAGE (10 % Gel), Detektion von Bcl-2 mittels polyklonalen Antikörpers. Nur die Bande für Bcl-2 (29 kDa) erscheint.*

#### 3.2.4.2.3.2 Ist die Aktivierung der JNK für den Ajoen-induzierten Zelltod notwendig?

Durch den Einsatz von JNK Inhibitoren wurde untersucht, ob die JNK in der Ajoen-induzierten Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Bisher standen keine erwerbbaeren Inhibitoren zur Verfügung. Jedoch existieren Untersuchungen zum p38 MAPK Inhibitor SB 203580, in denen man die Aktivität der JNK durch Einsatz hoher Konzentrationen des Inhibitors (100  $\mu$ M) unterdrückte<sup>149,150</sup>. Wir untersuchten die Fähigkeit von SB 203580 (100  $\mu$ M), die Aktivierung der JNK zu hemmen. Der Einsatz führte zu einer Abnahme der Phosphorylierung der JNK2 (p54, obere Bande, Abb. 55A). Die Überprüfung des Effekts auf die Apoptoserate zeigte: eine Aktivierung der JNK2 ist für den Ajoen-induzierten Zelltod nicht notwendig (Abb. 55B).

A



B

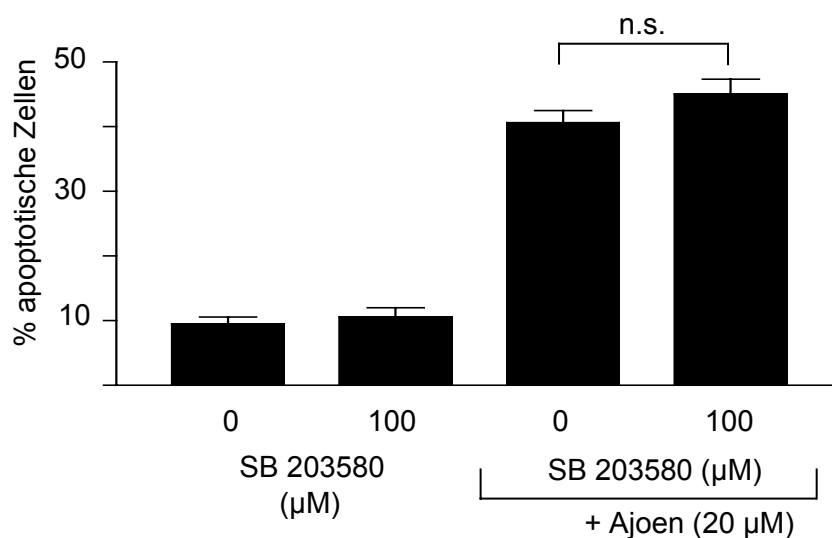


Abb. 55: Einfluss von SB 203580 auf die Aktivierung der JNK und die Apoptoserate. HL-60 Zellen, mit Ajoen (20  $\mu$ M) behandelt bzw. unbehandelt oder nur mit SB 203580 (100  $\mu$ M) versetzt, oder 1 h mit 100  $\mu$ M SB 203580 vorinkubiert, dann mit Ajoen (20  $\mu$ M) stimuliert. **A** Phosphorylierte Form der JNK nach 3 h Inkubation mit Ajoen per Western Blot detektiert (A). **B** Detektion der Apoptoserate nach Vorinkubation mit SB 203580 (100  $\mu$ M) und anschließender Ajoen-(20  $\mu$ M, 6 h) Behandlung. Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. n.s. = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni).

Um Klarheit über den Einfluss der JNK in der Ajoen-induzierten Apoptose zu erlangen, setzten wir Zellen ein, die konstitutiv eine nicht phosphorylierbare Form der JNK1 überexprimieren (HL-60/DN-JNK). Dabei war zunächst diese Eigenschaft der Zellen zu überprüfen. HL-60/DN-JNK Zellen wurden mit Ajoen (20  $\mu$ M) über 1-4 h inkubiert und die Aktivierung von JNK1 mit der Aktivierung in HL-60 Zellen verglichen. In HL-60/DN-JNK Zellen erfolgte die Phosphorylierung der JNK1 nach Ajoen-Gabe in geringerem Ausmaß als in HL-60 Zellen (Western Blot, Abb. 56A).

Der Vergleich der Zelltodrate in HL-60/DN-JNK Zellen mit Kontrollzellen (HL-60) zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 56B).

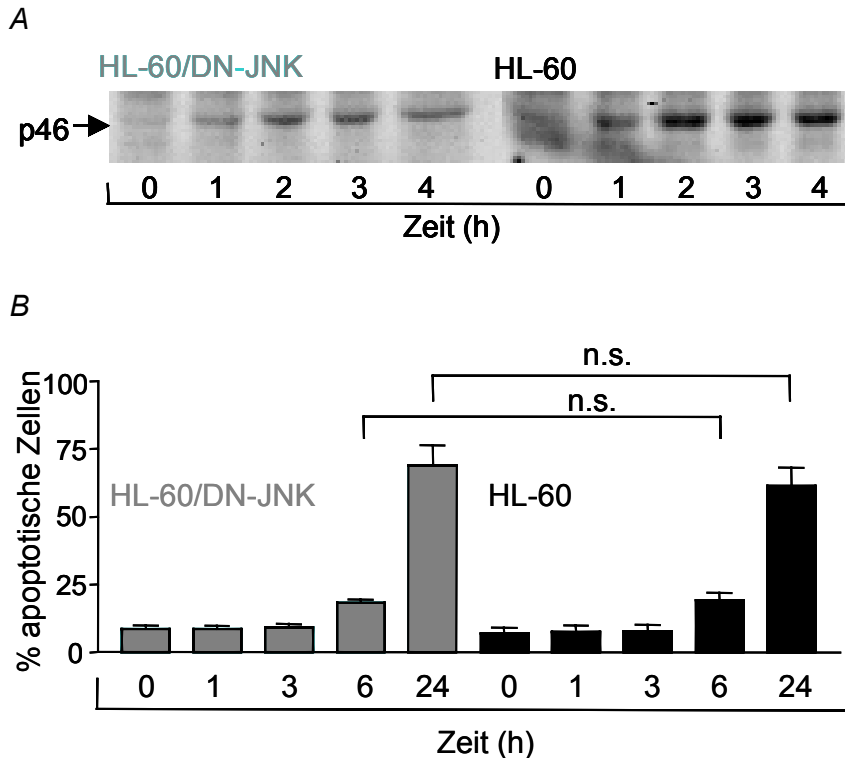


Abb. 56: Induktion der Apoptose in HL-60/DN-JNK versus HL-60 Zellen durch Ajoen. **A** Die Aktivierung der JNK1 in HL-60/DN-JNK Zellen nach Ajoen-Stimulation (20  $\mu$ M, 1-4 h) ist deutlich im Vergleich zu HL-60 Zellen reduziert. **B** HL-60/DN-JNK und HL-60 Zellen wurden 1-24 h mit Ajoen (20  $\mu$ M) inkubiert und die Apoptoserate wie beschrieben, bestimmt. n.s. = nicht signifikant (unpaired, two tailed student's t-test).

Diese Ergebnisse zeigen klar: die JNK ist an der Signalvermittlung in der Ajoen-induzierten Apoptose nicht beteiligt.

#### 3.2.4.2.4 Bedeutung der p38 MAPK im Signaltransduktionsweg

Die Stellung der p38 MAPK in der Signaltransduktion der Apoptose ist nicht eindeutig geklärt und wird noch kontrovers diskutiert. Um ihre Rolle im Signaltransduktionsweg von Ajoen zu untersuchen, setzten wir einen in niedrigen Konzentrationen spezifischen Inhibitor der p38 MAPK ein (SB 203580, 0,3-2  $\mu$ M)<sup>149,151</sup>. HL-60 Zellen wurden 1 h mit dem Inhibitor (0,5-2  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend mit Ajoen (20  $\mu$ M) behandelt. Die Inhibierung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Apoptoserate (Abb. 57).

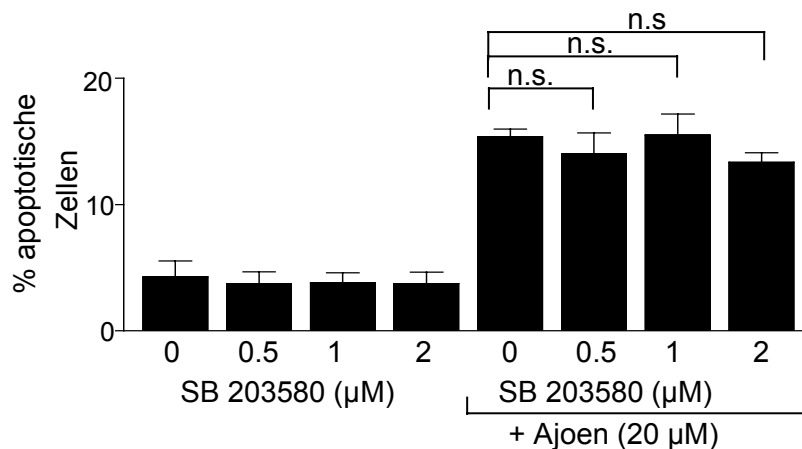


Abb. 57: p38 MAPK ist nicht im Ajoen-induzierten Signaltransduktionsweg involviert. HL-60 Zellen, mit SB 203580 (0,5-2 μM) für 1 h vorinkubiert, anschließende Zugabe von Ajoen (20 μM) für 6 h. Kontrolle: Zellen nicht oder nur mit Inhibitor behandelt (0,5-2 μM). Bestimmung der Apoptoserate wie in Abb. 56. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ± SEM (in Dreifachbestimmung). n.s. = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni).

Die Aktivierung der p38 MAPK ist für die Signalvermittlung in der Ajoen-induzierten Apoptose nicht notwendig.

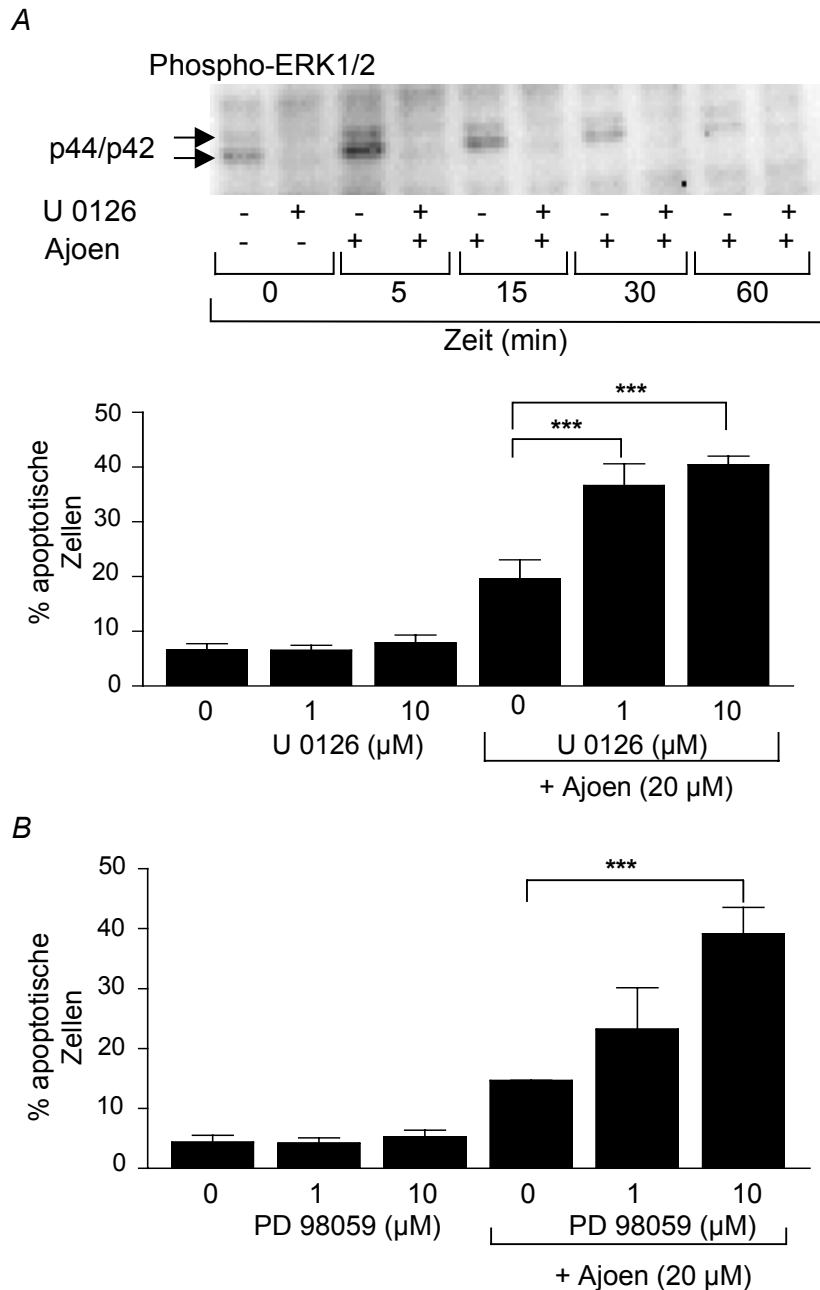
#### 3.2.4.2.5 Die Rolle der ERK1/2

In der Zellproliferation und im Zellwachstum wird den extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1/2 eine Schlüsselstellung zugeschrieben<sup>152</sup> (s.a. Einleitung). Wir fanden eine Aktivierung dieser MAPK in der Ajoen-induzierten Apoptose (s.a. Abb. 52) und interessierten uns daher für deren Bedeutung in diesem Zusammenhang.

Zu diesem Zweck wurden spezifische Inhibitoren, U 0126 und PD 98059 eingesetzt. Diese sind Hemmsubstanzen der hierarchisch übergeordneten MEK1/2<sup>153</sup> (s.a. Abb. MAPK-Signalkaskade). Es erfolgte eine vollständige Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung nach einstündiger Vorinkubation der Zellen mit U 0126 (10 μM) mit anschließender Behandlung mit Ajoen (20 μM) im Vergleich zu alleiniger Ajoen-Stimulation (Abb. 58 (A, oben)).

Die durchflusszytometrische Analyse der Zelltodrate ergab als Resultat eine signifikant erhöhte Apoptoserate nach Hemmung der ERK1/2 (durch Ausschalten von MEK1/2) mit nachfolgender Ajoen-Stimulation (Abb. 58A, unten).

Dieses Ergebnis wurde auch für den MEK1/2-Hemmer PD 98059 erhalten (Abb. 58B).



**Abb. 58:** Die Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung erhöht die Ajoen-induzierte Apoptose.

**A** obere Graphik: Western Blot zeigt keine ERK1/2-Aktivierung infolge Ajoen-(20 μM) Behandlung in Anwesenheit von U 0126 (10 μM). 50 μg Protein/Spur aufgetrennt durch SDS-PAGE (7,5 % Gel), phospho-ERK1/2 wie in Abb. 52 detektiert. Untere Graphik: HL-60 Zellen, vorinkubiert nur mit U 0126 (1, 10 μM, 1 h), oder mit U 0126 (1, 10 μM, 1 h) und anschließend mit Ajoen (20 μM) für 6 h stimuliert. Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (je in Dreifachbestimmung). \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA/Bonferroni). **B** HL-60 Zellen, vorinkubiert mit PD 98059 (1, 10 μM) 1 h, anschließend mit Ajoen (20 μM, 6 h) stimuliert. Kontrollzellen nicht oder nur mit PD 98059 (1, 10 μM) behandelt. Apoptoserate wie in A ermittelt.

Fazit: Die Unterdrückung der ERK1/2-Aktivierung führt zu einer Steigerung der Sensibilität der HL-60 Zellen gegenüber Ajoen.

In der Ajoen-induzierten Apoptose werden die MAPK JNK, p38 und ERK1/2 aktiviert. Für die JNK und p38 MAPK konnte gezeigt werden, dass sie in der Signaltransduktion keine Rolle spielen. Für die ERK1/2 Kinasen konnte mittels spezifischer Inhibitoren eine Schutzfunktion vor Apoptose nachgewiesen werden. Eine Inhibierung der ERK1/2 stellt somit eine mögliche Strategie in der Tumorthherapie dar, um Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu sensibilisieren<sup>153</sup> (s.a. Diskussion).

Die nachgewiesene Sensibilisierung der Tumorzellen gegen die zytotoxische Substanz Ajoen durch Ausschalten der ERK1/2 Kinasen führte uns zu einer zweiten regulatorischen Kinase, die Proteinkinase B/Akt. Akt spielt in der Entscheidung in der Zelle über Leben und Tod eine zentrale Rolle. In anderen Arbeitsgruppen konnte bereits eine Aktivierung der Akt durch zytotoxische Substanzen gezeigt werden<sup>154,155</sup>. Eine Hemmung der Akt führte in diesen Systemen zu einer gesteigerten Apoptose.

### 3.2.4.3 Proteinkinase B/Akt

#### 3.2.4.3.1 Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Ajoen

HL-60 Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit Ajoen (20  $\mu$ M) inkubiert und die Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Western Blot analysiert. Die Akt wurde bereits nach 5 min aktiviert, gefolgt von einer Steigerung bis 15 min und einer anschließenden raschen Abnahme der Aktivität. Als Positivkontrolle diente Etoposid<sup>154</sup> (E, 17  $\mu$ M). Etoposid aktivierte die Akt nach 2 h Inkubation (Abb. 59).

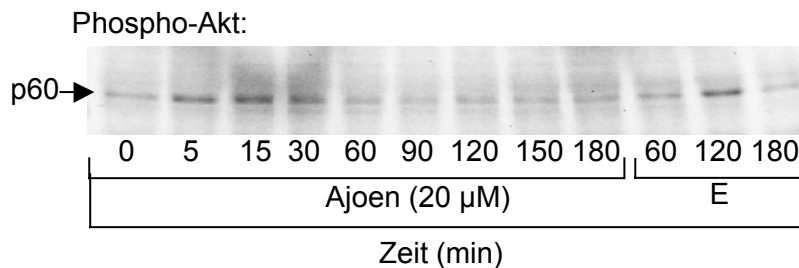


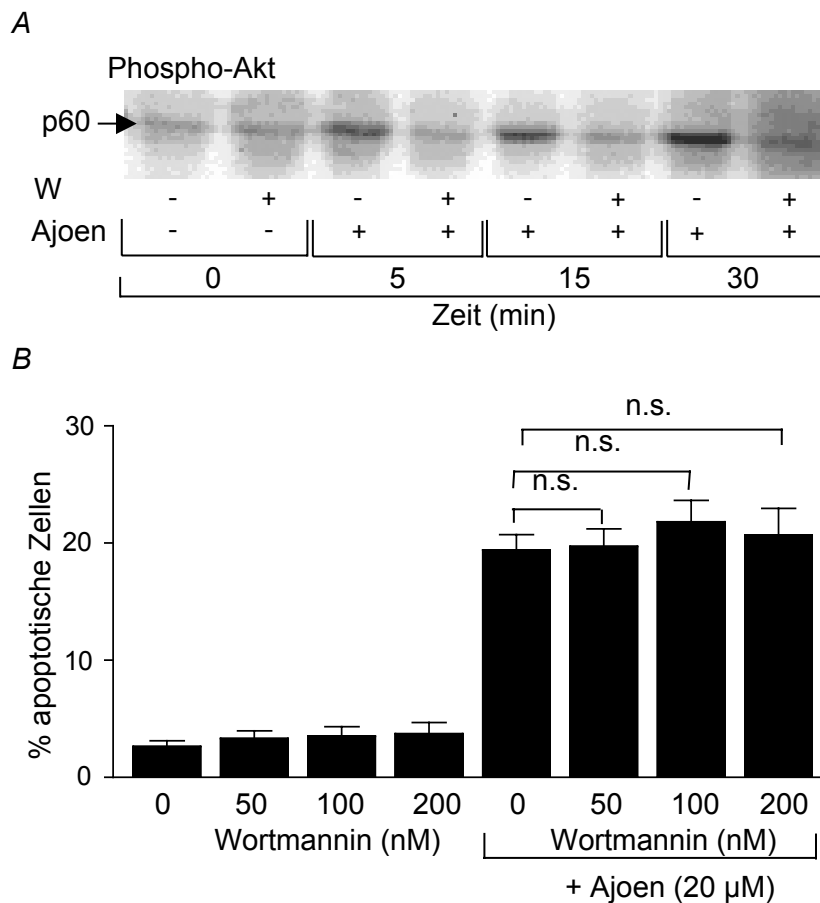
Abb. 59: Ajoen aktiviert die Proteinkinase B/Akt. Phosphorylierung der Akt (Western Blot). HL-60 Zellen, mit Ajoen (20 µM) inkubiert (0-180 min). Etoposid (E, 17 µM, 0-180 min) als Positivkontrolle. 60 µg/Bande über 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Detektion der Akt-Phosphorylierung mit polyklonalem Antikörper gegen die phosphorylierte (60 kDa) Form.

Die Frage nach der Relevanz der Akt-Aktivierung in der Ajoen-induzierten Apoptose stand nun im Mittelpunkt. Eine Hemmung der „Survival-Kinase“ Akt könnte ebenfalls eine Steigerung der Apoptoserate, also eine Sensibilisierung der Zellen zur Folge haben. Dies könnte auch eine potentielle Strategie in der Tumorbekämpfung sein.

#### 3.2.4.3.2 Bedeutung der Akt-Aktivierung für die Ajoen-induzierte Apoptose

Proteinkinase B/Akt spielt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung wachstumsfördernder und anti-apoptotischer Signale<sup>156,157</sup>. Um ihre Notwendigkeit in der Signalvermittlung in der Ajoen-induzierten Apoptose zu untersuchen setzten wir den spezifischen Hemmstoff Wortmannin ein<sup>151,154</sup>. Dieser hemmt die hierarchisch übergeordnete Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI<sub>3</sub>K). Wortmannin (100 nM) unterdrückte, wie erwartet, die Aktivierung der Akt (Abb. 60A). Jedoch hatte die Vorinkubation der HL-60 Zellen mit Wortmannin (50-200 nM, 1 h) keinen Effekt auf die Überlebensrate der Zellen nach anschließender Ajoen-Stimulation (20 µM) (Abb. 60B):





**Abb. 60:** Akt ist nicht in der Ajoen-induzierten Apoptose involviert.

**A** Wortmannin (W) verhindert die Phosphorylierung der Akt. HL-60 Zellen, 1 h mit Wortmannin (100 nM) vorbehandelt, anschließend mit Ajoen (20 µM, 0-30 min) inkubiert oder nur mit Ajoen (20 µM) stimuliert. 70 µg Protein durch SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt. Phospho-Akt wie in Abb. 59 detektiert. **B** HL-60 Zellen, mit verschiedenen Konzentrationen Wortmannin (50–200 nM) für 1 h inkubiert, anschließend mit Ajoen behandelt (20 µM, 6 h). Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten (in Dreifachbestimmung). n.s. = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni).

Ajoen induziert die Aktivierung der „Survival-Kinase“ Akt. Durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors der übergeordneten Kinase von Akt konnte gezeigt werden, dass die Akt in der Ajoen-induzierten Apoptose keine Rolle spielt.

#### 3.2.4.4 Zusammenfassung zum Kapitel 3.2.4

Ajoen induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die für die Induktion des Apoptoseprozesses von essentieller Bedeutung sind (Kapitel 3.2.4.1-3.2.4.1.5). Redoxsensitive MAPK sowie die Akt werden durch Ajoen aktiviert. Bis auf die MAPK ERK1/2 sind keine dieser Kinasen am Ajoen-

induzierten „Signalweg“ effektiv beteiligt. Für ERK1/2 konnte eine anti-apoptotische Rolle gezeigt werden (s. Kapitel 3.2.4.2.5). Die Untersuchungen zur Proteinkinase B/Akt bewiesen eine Aktivierung. Jedoch besitzt die Akt als „Survival-Kinase“ in der Ajoen-induzierten Apoptose keinen Einfluss.

## 4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Signaltransduktionswegen über die Ajoen in menschlichen Leukämiezellen Apoptose induziert.

### *Ajoen induziert Apoptose*

Dirsch et al.<sup>5</sup> zeigten bereits eine Induktion von Apoptose in der akut-myeloisch-leukämischen Zelllinie HL-60.

In den Experimenten dieser Arbeit löste Ajoen zwischen 5 und 20  $\mu\text{M}$  Apoptose aus. Ziel der Arbeit war es die Vorgänge, die zur Apoptose in HL-60 Zellen führen, zu identifizieren.

### *Die Ajoen-induzierte Apoptose verläuft abhängig von der Aktivierung von Caspasen*

In dieser Arbeit zeigten wir, dass Ajoen-Behandlung von HL-60 Zellen zur proteolytischen Spaltung von Caspase-3-ähnlichen Caspasen führt. In der Literatur existieren aber auch Untersuchungen, in denen die Apoptose nicht von der Aktivierung von Caspasen abhängig ist. Dabei spielen pro-apoptotische Faktoren wie z.B. AIF (Apoptosis-Inducing Factor) eine wichtige Rolle<sup>47</sup>. Die Frage nach der Bedeutung der Aktivierung von Caspasen für die Ajoen-induzierte Apoptose stand zunächst im Mittelpunkt: Die Aktivierung der Caspasen war für den Ajoen-induzierten apoptotischen Zelltod notwendig, da der Einsatz von einem Breitbandcaspaseinhibitor (z-VAD-fmk) die DNA-Fragmentierung vollständig verhinderte.

PARP ist ein Substrat aktiver Caspase-3. Wir wiesen die Spaltung von PARP und damit die Gegenwart aktiver Caspase-3 nach. Interpretiert man die Spaltung von PARP, das ein DNA-Reparaturenzym ist, so sieht man doch einen Sinn in der Inaktivierung: 1.) Spaltung des Enzyms führt zu einer Ersparnis an ATP und  $\text{NAD}^+$ , da die Aktivität des Enzyms ein energieverbrauchender Prozess ist und diese Energie nun für den apoptotischen Prozess zur Verfügung steht. 2.) Die Zerstörung von PARP führt zu einer Akkumulation von DNA-Strangbrüchen, die nicht mehr repariert werden und ihrerseits Apoptose und den Zelltod vorantreiben<sup>158</sup>.

Da DNA-Fragmentierung und die PARP-Spaltung Indizien für die Aktivierung der Effektorcaspase-3 sind, suchten wir auch per Western Blot nach ihrer

Aktivierung, mit positivem Ausgang: Ajoen induziert die Aktivierung der Procaspase-3.

Caspase-3 ist eine der wichtigsten Effektorcaspasen. Ihre Aktivierung führt zu Kernauflösung bzw. Aktivierung weiterer Faktoren, wie z.B. DFF (DNA-Fragmentation Factor) <sup>159</sup>.

Auf der Suche nach weiteren Caspasen, die noch durch Ajoen aktiviert werden könnten, fanden wir die Caspase-8. Interessanterweise, und dies wird hier schon vorweg angemerkt, werden Caspase-3 und -8 im selben Zeitraum nach Ajoen-Exposition aktiviert.

#### *Untersuchungen zur CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose*

Wie oben ausgeführt, kommt es zur Caspase-8 Aktivierung nach Ajoen-Exposition. Welche Bedeutung hat nun die Caspase-8 in der Ajoen-induzierten Apoptose? Die Caspase-8 ist meist als Initiatorcaspase beschrieben, welche die Weiterleitung des Signals vom CD95-Rezeptor/CD95-Ligand vermittelt. Das Enzym wird aufgrund der langen Prodomäne und zweier charakteristischer Todeseffektordomänen (DED) als Initiatorcaspase klassifiziert <sup>22,24</sup>.

Ihre Aktivierung lässt gewöhnlich eine Induktion des Todessignals über den CD95/CD95L-Signalweg vermuten, wie dies für verschiedene Chemotherapeutika als gesichert gilt, die Apoptoseinduktion über diesen Signaltransduktionsweg induzieren <sup>130,160</sup>. Unsere Untersuchungen zeigten, dass zwar der HL-60 Klon CD95-Rezeptoren besitzt, aber der natürliche Ligand keine Apoptose induzierte. Das lässt Spekulationen über einen funktional inaktiven Rezeptor zu.

Die Funktionsfähigkeit des eingesetzten CD95-Liganden (CD95L) wurde anhand CD95L sensibler Jurkat Zellen überprüft. Dass HL-60 Zellen nicht reagieren, könnte man als einen Hinweis auf einen Fehler in der Signaltransduktion vom CD95-Rezeptor „abwärts“ werten (ein Defekt/eine Mutation). Viel naheliegender ist aber das Vorliegen eines nicht ausgereiften Rezeptorsystems:

Ohashi et al. <sup>132</sup> diskutierten eine potentielle Verbindung zwischen der CD95-Rezeptorexpression und der Reifung von peripheren Vorläuferzellen: HL-60 können als Vorläuferzellen von Granulozyten und Monozyten gesehen werden, denn sie können durch verschiedene Stimulantien zu Granulozyten (DMSO, Vit. A Säure) und Monozyten (z.B. Vit. D<sub>3</sub>) ausdifferenziert werden.

Ohashi et al.<sup>132</sup> analysierten die CD95-Rezeptorexpression in undifferenzierten und ausdifferenzierten HL-60 Zellen und wiesen nach, dass undifferenzierte HL-60 Zellen wenig Rezeptoren im Vergleich zu den jeweils ausdifferenzierten Zellen exprimierten. Auch zeigten sie eine Resistenz der undifferenzierten HL-60 Zellen gegenüber Apoptose-induzierendem CD95-Antikörper, während die zu Granulozyten ausdifferenzierten Zellen sensitiv, die zu Monozyten differenzierten nur teilweise sensitiv reagierten. Die Möglichkeit eines inaktiven/unausgereiften Rezeptors ist in unserem Fall also gegeben.

In der Literatur existieren Hinweise auf Inhaltsstoffe aus Knoblauch oder Zwiebel, welche die Differenzierung von HL-60 Zellen in Richtung Granulozyten induzieren können<sup>161</sup>. Könnte nun Ajoen HL-60 Zellen ausdifferenzieren und so die Zellen sensibilisieren? Die Versuche mit 20 µM Ajoen führen nach 6 h bereits zu 30-40 % apoptotischen Zellen. Der Zeitraum für eine Ausdifferenzierung ist somit zu kurz. Die Vorversuche mit niedrigen Konzentrationen (5-20 nM) führten innerhalb von 72 h zu keiner Differenzierung und die lichtmikroskopische Kontrolle ließ keine Zytotoxizität erkennen. Der Weg der Apoptoseinduktion über Differenzierung und dadurch erhöhte CD95-Rezeptorexpression ist also nicht, wie bei Ohashi et al.<sup>132</sup>, gegeben.

Eine gewisse Wahrscheinlichkeit bestand für die Möglichkeit, Ajoen würde die Expression von funktional aktiven CD95-Rezeptoren und/ oder die Expression von CD95-Ligand induzieren, wie es für andere Chemotherapeutika schon gezeigt wurde<sup>160,162-164</sup>. Der Weg über gesteigerte CD95-Rezeptor und/oder -Ligand Expression und Auslösung des Todes über „Andocken“ der eigenen, sezernierten Liganden und Erregung der neu gebildeten, funktionsfähigen Rezeptoren wäre vorstellbar gewesen. Die Inkubation mit Ajoen brachte jedoch keine Erhöhung der Rezeptorexpression. Weitere Überlegungen leiten sich aus den Befunden der Arbeit und der Literatur her: Da für Ajoen membranverändernde Wirkungen diskutiert werden (s. a. TEM Diskussions- teil), könnte eine Sensibilisierung derart erfolgen, dass Ajoen einen Einfluss auf die Rezeptorstruktur oder auf die darunterliegenden Signalwege ausübt (erleichterte DISC Bildung etc.). Vorinkubation mit Ajoen und anschließende CD95L-Exposition brachte aber keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Ajoen Gabe. Dies jedoch spricht für eine Nichtbeteiligung des CD95-Rezeptor-Systems in der Ajoen-induzierten Apoptose.

Einen überzeugenderen Beweis der Apoptoseinduktion ohne Beteiligung des CD95-Rezeptors erhielten wir durch Versuche mit CD95-resistenten Jurkat Zellen. Diese Zellen starben durch Ajoengaben in dem selben Ausmaß wie die Kontrollzellen.

Abschließende Untersuchungen zur Bedeutung der Caspase-8 Aktivierung, die ja in erster Linie in Zusammenhang mit der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose gesehen wird, zeigten mittels eines spezifischen Inhibitors die Einflusslosigkeit ihrer Aktivierung auf die Zelltodrate.

Dieses Ergebnis zwingt zur Überlegung, welche Bedeutung ihre Aktivierung sonst haben könnte. Einerseits kann es sein, dass die Caspase-8 im Zuge der Aktivierung der Caspasen-Kaskade mitaktiviert wird und so eine „downstream“ oder „Effektorcaspase“ ist. Andererseits ist für Typ II Zellen, wie es z.B. HL-60 Zellen sind, eine *starke* Aktivierung der Caspase-8 erst „downstream“ der Mitochondrien beschrieben worden <sup>37</sup>. Auch diese Möglichkeit stellt einen Ansatzpunkt für Interpretationen dar: Aktivierte Caspase-8 spaltet Bid zu t-Bid <sup>165</sup>. Auch in diesem vorliegenden Fall könnte die Aktivierung der Caspase-8 zur Bid-Spaltung führen, das dann zu den Mitochondrien transloziert und dort über die Freisetzung von Cytochrom c zur Weiterleitung der Signalkette führt und diese noch verstärkt („Amplifizierungsloop“). Die Ergebnisse und Überlegungen rückten die Mitochondrien in den Brennpunkt des Interesses:

#### *Untersuchungen zur Mitochondrien-vermittelten Apoptose*

Kennzeichen eines Signaltransduktionsweges, der über Mitochondrien vermittelt ist, sind die Erhöhung der Permeabilität der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran. Die Permeabilitätsänderung der inneren Membran ist durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gekennzeichnet. Die Permeabilitätsänderungen verursachen letztendlich die Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom c, ins Zytosol. Freigesetztes Cytochrom c bindet an das zytoplasmatische Protein Apaf-1, welches anschließend eine Konformationsänderung erfährt. Dadurch kann Procaspase-9 binden und zur aktiven Caspase-9 geschnitten werden. Diese Caspase induziert die Aktivierung von untergeordneten Caspasen

(„downstream“), z.B. Caspase-3, die wiederum weitere Caspasen aktiviert, z.B. Caspase-6<sup>22,24,158</sup>.

Wir konnten eine Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol nach Ajoen-Stimulation nachweisen. Eine deutliche Freisetzung erfolgte innerhalb 4 h nach Ajoen-Exposition, eine Zeitspanne, die die Cytochrom c-Freisetzung als ein frühes Ereignis, vor der Aktivierung der Caspasen in der Signalkaskade erscheinen lässt.

Die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran ist meistens, aber nicht immer, mit einer Permeabilitätsänderung an der inneren mitochondrialen Membran verbunden, gekennzeichnet durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials<sup>42,166</sup>. Mittels des Fluorochroms JC-1 war auch eine Permeabilisierung der inneren mitochondrialen Membran zu bestätigen. Dies geschah im gleichen Zeitrahmen, in dem auch die äußere Membran durchlässig wurde. Ajoen induziert also eine Permeabilisierung der inneren und äußeren Membran. Wie diese Permeabilisierungen vonstatten gehen könnten, wird in der Literatur noch diskutiert. Die Permeabilisierung der inneren Membran, gekennzeichnet durch den Membranpotentialverlust führt zur Matrixschwellung und anschließender Ruptur der äußeren Membran, was man aus den Ergebnissen der TEM-Untersuchungen auch interpretieren kann (siehe Diskussion dort). Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass die Cytochrom c-Freisetzung bei Ajoen-Behandlung durch Matrixschwellung und Ruptur der äußeren Membran verursacht ist, da Vorversuche mit Bongkrekic-Säure (BA ist ein Inhibitor, der die Öffnung der PTP verhindert) die „Kanaltheorie“ (Öffnung von sonst kontrollierten Kanälen) als unwahrscheinlich erscheinen lassen.

Cytochrom c ist in der Signaltransduktion ein stark beachtetes Protein. Berichte belegen Apoptoseauslösung durch Mikroinjektion von Cytochrom c in das Zytosol einer Zelle (Human Kidney 293 Zellen) und den Start einer Apoptosekaskade<sup>167</sup>.

In unserem Fall könnte die Freisetzung von Cytochrom c einem Verstärkermechanismus („Amplifizierungsloop“) folgen, denn enge Zeitverläufe (0,5 h Abstand) deuten auf eine schnelle (innerhalb der ersten 30 min) aber schwache, und dann auf eine verstärkte (ab 3 h) Cytochrom c-Freisetzung hin. Nachfolgende Abläufe sind anhand dieser Daten vorstellbar: eine schwache Cytochrom c-Freisetzung führt zu einer schwachen Caspaseaktivierung und zur Beteiligung weiterer, größtenteils noch unbekannter Faktoren. Ein bekannter Faktor ist z.B. t-Bid. Möglich wäre z.B.

die Aktivierung der Caspase-8 nach Cytochrom c-Freisetzung, diese könnte Bid zu t-Bid spalten, das anschließend zu den Mitochondrien transloziert und wiederum zu deren „Aktivierung“ führt und so der „Loop“ geschlossen wird. Dies lässt auch die beobachtete Aktivierung der Caspase-8 wieder sinnvoll erscheinen.

In der Literatur ist die Schutzwirkung anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie wie Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 gegen z.B. Etoposid-induzierte Apoptose beschrieben<sup>54,140</sup>. Das Chemotherapeutikum Etoposid löst eine Mitochondrien-kontrollierte Signaltransduktion aus. Manche Tumore/entartete Zellen reagieren auf Chemotherapeutika nicht mit Apoptoseinduktion<sup>168-170</sup>. Analysiert man diese Krebsarten auf die Expression von anti-apoptotischen Proteinen, so kann man eine erhöhte Expression dieser Proteine finden. Diese könnten der Grund für das „Versagen“ der Therapie sein<sup>140</sup>. Beispiele wären das Non-Hodgkin-Lymphom<sup>171</sup>, Brust- und Prostatakrebs, aber auch Lungenkrebs und Leukämie<sup>172</sup>. In Phase I bzw. Phase II klinischer Studien befinden sich bereits Präparate zur Bcl-2-antisense-Therapie. Sie soll die Expression von Bcl-2 verhindern<sup>173</sup> und dadurch die Tumorzellen auf Chemotherapeutika sensibilisieren.

Nachdem unsere Ergebnisse die Induktion über den CD95-Rezeptor ausschlossen und eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach Ajoen-Exposition stattfand, ist die Frage, ob Ajoen einen Mitochondrien-abhängigen Signalweg, wie er z.B für Etoposid<sup>54</sup> beschrieben ist, induziert. Die Überprüfung kann mit Zellen, die anti-apoptotisches Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, durchgeführt werden. Die Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2- oder Bcl-x<sub>L</sub>-Protein führt zur Verhinderung der mitochondrialen Ereignisse wie Cytochrom c-Freisetzung als Folge einer Vielzahl apoptotischer Stimuli<sup>24,54,137</sup>.

Wie bei Etoposid, das zu Kontrollzwecken in dieser Arbeit eingesetzt wurde, müsste, wenn der Signaltransduktionsweg von der mitochondrialen Dysfunktion abhängt, eine Überexpression dieser Proteine die Apoptose inhibieren können. Die Untersuchungen verliefen positiv: in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen war der Ajoen-induzierte Zelltod signifikant erniedrigt, die DNA-Fragmentation unterdrückt. Diese Ergebnisse legen die Abhängigkeit der Ajoen-vermittelten Apoptose von der induzierten mitochondrialen Dysfunktion nahe.



Erinnert sei an die Spaltung der „Effektorcaspase-3“ und der „Initiatorcaspase-8“, die gleichzeitig erfolgte, beide zeitlich der Cytochrom c-Freisetzung nachfolgend. Der Einsatz des Breitbandcaspaseinhibitors z-VAD-fmk bestätigte die Reihenfolge: Die Cytochrom c-Freisetzung konnte „upstream“ der Caspaseaktivierung nachgewiesen werden.

Versuche mit HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen ergaben sowohl eine signifikant reduzierte und verzögerte Caspase-3-ähnliche Aktivität als auch eine verzögerte und abgeschwächte Caspase-3 Spaltung im Western Blot. Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression verhinderte zudem die Caspase-8 Aktivierung völlig. Dies sind klare Beweise für die Mitochondrien-kontrollierte Caspase-3 als auch Caspase-8 Aktivierung. Hier setzte nun wieder die Überlegung zur Bewandnis der Caspase-8 Aktivierung für die Ajoen-induzierte Apoptose ein.

Der Zeitrahmen, in dem Caspase-3 und Caspase-8 aktiviert werden, würde ein Modell vorschlagen, in dem beide Caspasen durch ein gemeinsames „upstream Event“, z.B. die Aktivierung der Procaspase-9, aktiviert werden könnten. Dagegen spricht allerdings der Befund, dass in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen die Caspase-8 Spaltung vollkommen aufgehoben war, während die Caspase-3 Aktivierung abgeschwächt und zeitlich verzögert erfolgte. Somit weist die Gesamtkonstellation eher darauf hin, dass zur Aktivierung der Caspase-8 die vorangegangene Spaltung der Caspase-3 benötigt wird. Die Literatur berichtet die notwendige Präsenz aktivierter Caspase-9, Caspase-3 sowie wahrscheinlich auch Caspase-6, wenn die Spaltung der Caspase-8 „downstream“ der Mitochondrien geschehen soll <sup>136,174,175</sup>.

Da Caspase-3 in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> zu gering aktiviert war, könnte ihre Aktivität für die Spaltung der Procaspase-8 nicht mehr ausgereicht haben.

Weitere Überlegungen führen zu der Möglichkeit, dass Procaspase-8 direkt, also unabhängig von der Caspase-3 Aktivierung, von einem freigesetzten mitochondrialen Faktor gespalten wird, dessen Aktivität in Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen blockiert ist. Diese letztere Möglichkeit wäre in Übereinstimmung mit dem Modell, das für den „CD95-Pathway“ in Typ II Zellen vorgeschlagen ist <sup>37</sup>. Studien mit spezifischen Caspaseinhibitoren gegen Caspase-3 und -8 könnten diesen Sachverhalt der Aktivierungshierarchie in der Ajoen-induzierten Apoptose klären.

Das eindeutige Ergebnis, nämlich die ungehinderte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach Einsatz des Breitbandcaspaseinhibitors z-VAD-fmk, beweist die Annahme, dass zwischen der Apoptoseinduktion durch Ajoen und den Mitochondrien keine Caspasen

aktiviert werden. Auch eine Verstärkung der Cytochrom c-Freisetzung via Caspase-8 und Bid-Spaltung kann durch dieses Experiment als eher unwahrscheinlich angesehen werden.

Die Cytochrom c-Freisetzung durch Matrixschwellung und Membranruptur oder durch Membraneffekte von Ajoen rücken durch diese Gesamtbewertung vermehrt in den Vordergrund des Interesses.

### *Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen*

HL-60 Zellen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, sind vor Ajoen-induzierter Apoptose geschützt. Vorrangiges Untersuchungsziel waren die (möglichen) intrazellulären, morphologischen Veränderungen von HL-60/neo Zellen und HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen nach Ajoen-Exposition. Besonderes Augenmerk richtete man auf die Mitochondrien, weil für Ajoen eine Mitochondrien-abhängige Apoptoseinduktion klar gezeigt war.

Bei der Auswertung der TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte sind Unterschiede zwischen dem Membran/Matrixkontrast der Mitochondrien vor und nach Stimulierung von ausschlaggebender Bedeutung, wobei der Kontrast der Kernhüllmembranen als Referenz herangezogen wird. Ein verstärkter Kontrast rührt von einer verstärkten „Reaktion“ mit Osmium-/Blei-/Uranylacetat her. Kontrastunterschiede deuten auf veränderte Membranzusammensetzungen/eigenschaften hin („höherer Anteil von Transmembranproteinen“): Stärkere Kontraste stehen für stärkere „physiologische Aktivität“ der Membranen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. G. Wanner). Hypothetisch ist eine Reaktion des Osmium-/Blei-/Uranylacetats mit dem in/an die Membran angelagerten Ajoen/Ajoen-Metaboliten möglich, was zusätzlich zu einer verstärkten Kontrastierung führen könnte („Schwermetall mit sulfidischen Gruppen“).

Bei *Kontrollzellen* liegen folgende Beobachtungen vor:

In HL-60/neo sind die Mitochondrien durch ihren Membrankontrast gut zu erkennen. Das Verhältnis der Kontraste der mitochondrialen Membranen zur Kernmembran ist in etwa gleich.

Dagegen sind die Mitochondrien in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Kontrollzellen aufgrund ihres schwachen Kontrastes bei niedriger Vergrößerung schwer zu erkennen. Ihr Kontrast im Vergleich zur Kernmembran ist wesentlich schwächer. Dies lässt

eine geringere mitochondriale „Membranaktivität“ in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen vermuten (vergl. Abb. 41 und Abb. 42).

#### Zellen nach *Stimulation*:

Hier verlieren die mitochondrialen Membranen in HL-60/neo Zellen an Kontrast im Vergleich zur Kernmembran, in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen nimmt er hingegen deutlich zu.

Eine Erklärung auf Basis der oben formulierten „Osmium-/Blei-/Uranyl-Sulfid-Hypothese“ ergibt folgende Abläufe: Bei den HL-60/neo Zellen setzt nach Ajoen-Stimulation die Dysfunktion der mitochondrialen Membranen ein, die Membranintegrität nimmt ab, wahrscheinlich durch Ablösung von Membran-Ajoen/Metabolit-Fraktionen und deren Verteilung in der Zelle, was zu einer schwächeren Kontrastierung durch Osmium-/Blei-/Uranylacetat führt.

In den stabilisierten mitochondrialen Membranen der HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen sammeln sich Ajoen/Metaboliten in vollem Umfang an, die Kontrastierung der Membranen durch Osmium-/Blei-/Uranylacetat nimmt deutlich sichtbar zu. Die Anwesenheit des Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins hat nach Stimulation mit Ajoen zu einer sehr deutlichen Zunahme der Membranaktivität geführt.

Bei der Betrachtung ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine Momentaufnahme nach dreistündiger Stimulation handelt, und der Schutz durch Bcl-x<sub>L</sub> nur transient ist. Unter diesen Gesichtspunkten ist die nachfolgende Auswertung der mitochondrialen Zustandsformen zu sehen:

#### Auswertung der morphologischen Veränderungen

Vergleicht man den Prozentanteil degenerierter Mitochondrien/Flächeneinheit nach Ajoen-Exposition, so ist zwar ein erhöhter Anteil degenerierter Mitochondrien in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen zu erkennen, aber die Zahl der zytoplasmatischen Vesikel ist erheblich kleiner. Dies deutet auf Veränderungen hin, die aber verglichen mit den HL-60/neo Zellen nicht so weit fortgeschritten sind. Die Mitochondrien in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen sind, gemessen am Volumenanteil der Ultradünnschnitte, nach Stimulation tendenziell gleich groß wie die in HL-60/neo. Die Analyse des relativen Vesikelvolumens aber zeigt in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen einen signifikanten Unterschied: Bei HL-60/neo Zellen steigt das relative Vesikelvolumen von 0 % auf ca. 90 % relativer Volumenanteil bezogen auf das Zytoplasmavolumen,

bei HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen nur von 0 % auf ca. 20 % an. Die Degeneration der Mitochondrien erfolgt in HL-60/neo erheblich schneller. Aus den angegebenen Daten (und den Befunden der verzögerten und abgeschwächten Apoptose in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen) lässt sich Folgendes ableiten:

Die morphologischen Veränderungen durch Ajoen erfolgen auch in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen, jedoch zeitlich verzögert. Der Anteil degenerierter Mitochondrien in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen ist zwar erhöht, aber der Volumenanteil der Vesikel der Ultradünnschnitte signifikant reduziert. Das könnte bedeuten, und das unterstützt die Hypothese, dass in HL-60/neo Zellen schon mehr Mitochondrien mit anderen Membranen (z.B. aus dem ER, eventuell sogar mit anderen Mitochondrien) zu Vesikeln fusioniert sind als in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen. Für Ajoen ist eine membrandestabilisierende Wirkung bereits beschrieben<sup>82</sup>. Die mögliche Auflösung der Membranen und die Fusion der Kompartimente zu Vesikeln könnte durch die Wirkungen des Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins in den Bcl-x<sub>L</sub> Zellen unterdrückt bzw. zeitlich verzögert sein. Den Bcl-2-Proteinen ist schließlich eine membranstabilisierende Wirkung zugeschrieben<sup>176</sup>.

Die morphologischen Befunde können mit den molekularbiologischen Erkenntnissen zur Deckung gebracht werden, denn die zeitliche Verzögerung und Abschwächung der Effekte konnte auch für die Aktivierung der Caspase-3-ähnlichen Caspasen bzw. die Aktivierung der Caspase-3 und -8 bewiesen werden.

Romano et al.<sup>100</sup> haben eine rein physikalische Zerstörung der Zellkompartimente durch Membraneffekte des Ajoens bei Konzentrationen um 100 µM ausgeschlossen. Wie bei DMSO ist auch für Ajoen eine „Lösung“ in der Membran zu vermuten. Naheliegender ist aber die Erklärung, dass Membraneffekte Veränderungen im Elektrolythaushalt der Zelle hervorrufen, die zu Wassereinstrom führen, der die Kompartimente zur Ruptur bringt.

Auch bei der hier eingesetzten Konzentration (20 µM) geben die EM-Untersuchungen Hinweise auf Membraneffekte und dadurch hervorgerufene Veränderungen der Füllungsverhältnisse in den Kompartimenten. Dies wird durch Analyse der Vesikelbildung deutlich. In HL-60/neo Zellen ist der „Ajoen-Effekt“ zuerst im zytoplasmatischen Bereich zu beobachten; das ER verändert sein Lumen, indem es offensichtlich anschwillt. Dies könnte durch veränderte Elektrolytkonzentrationen erklärt werden.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass Ajoen zu einer Veränderung in den Membranen führt, so dass diese zu fusionieren beginnen und dadurch

der Eindruck einer Lumenschwellung entsteht. Dieses scheint im zytoplasmatischen Bereich (ER) zu beginnen und greift dann auf die Mitochondrien und die Kernmembran über. Die Dilatation der Kernmembran ist deutlich zu erkennen. Zur Feststellung der zeitlichen Abfolge wären jedoch weitere Untersuchungen mit Zeitkinetik und Serienschnittrekonstruktionen nötig. Ein Hinweis auf die Fusion der Membranen ist die auffällige Ko-Lokalisation von Mitochondrien und Vesikeln. Die Vesikelbildung könnte durch Schwellung des Lumens zwischen innerer und äußerer Membran entstehen. Um dies zu erhärten, wären noch weitere Untersuchungen nötig.

#### *Potentielle Mediatoren der Signaltransduktion*

Frühere Daten zeigten, dass die Ajoen-induzierte Apoptose durch die Freisetzung von ROS und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B gekennzeichnet ist<sup>5</sup>. Diese Ergebnisse führten zu der Frage, wie die damaligen Ergebnisse mit den vorliegenden Ergebnissen (Ajoen induziert einen intrinsischen Signalweg) in Zusammenhang stehen.

Die Ajoen-induzierte ROS-Produktion steht mit der Apoptoseinduktion in kausalem Zusammenhang<sup>5</sup>. Der Einsatz des Antioxidans N-Acetylcystein verhinderte sowohl die Ajoen-verursachte ROS-Produktion als auch die sonst folgende Apoptose.

Weitere Überlegungen führten zur Frage nach den weiteren Konsequenzen der ROS-Generierung für den Signaltransduktionsweg.

Einige zytotoxische Substanzen zeigen Apoptoseinduktion über reaktive Sauerstoffspezies (meist in Form von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als ein typischer Marker für die Generierung von ROS)<sup>61,69</sup>. Bei der Suche nach der „Herkunft“ der ROS stellte sich ihre Entstehung „upstream“ von den Mitochondrien und „upstream“ der Caspasen (gezeigt für Caspase-3) heraus.

Die ROS-Entstehung ist nicht nur für die Apoptose kausal von Bedeutung (NAC Experimente), sondern die Ergebnisse der ROS-Aktivierung als „upstream Event“ könnten den ROS eine zentrale Rolle in der Induktion der Apoptose durch Ajoen zuweisen: für leukämische Zelllinien gilt als erwiesen, dass die ROS-Produktion über die Aktivierung von MAPK zum Zelltod führen kann<sup>69-72</sup>. Ein Target aktivierter MAPK ist der Transkriptionsfaktor AP-1, dessen Aktivierung wir zeigten. Diese Aktivierung war durch Einsatz des

Antioxidans NAC hemmbar. Somit gilt eine Induktion der Apoptose über ROS und die Aktivierung der MAPK sowie AP-1 als wahrscheinlich.

Untersuchungen zur Aktivierung der MAPK JNK, p38 und ERK1/2 in der Ajoen-induzierten Apoptose ergaben ihre Aktivierung mit unterschiedlichen Aktivierungszeitpunkten und unterschiedlicher Aktivierungsdauer.

Sind die MAPK nun in den Signalweg der Ajoen-induzierten Apoptose involviert, indem sie das Signal von den ROS zu den Mitochondrien weiterleiten? Für andere Chemotherapeutika ist diese Signalkaskade bereits beschrieben<sup>69,70</sup>. Unsere bisherigen Ergebnisse ließen dies vermuten. Deshalb untersuchten wir die Involvierung der MAPK in der Signaltransduktion genauer:

Für die JNK gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die eine persistente Aktivierung der JNK durch z.B. UV oder  $\gamma$ - Bestrahlung<sup>142-145</sup>, zytotoxische Substanzen<sup>69,71,147,148,177-179</sup> und Verbindungen wie Isothiocyanate<sup>70</sup> zeigen, die zum apoptotischen Zelltod führen.

Tournier et al.<sup>142</sup> behaupten eine Notwendigkeit der JNK-Aktivierung für Stress-induzierte mitochondriale Signalwege. Für Ajoen zeigten wir jedoch, dass JNK nicht für die Ajoen-induzierte Signaltransduktion über Mitochondrien von Bedeutung ist: In Zellen, die das anti-apoptotische Bcl-x<sub>L</sub>-Protein überexprimieren, wird die JNK genauso aktiviert wie in den Kontrollzellen (HL-60/neo), ein Hinweis auf die unabhängig von der mitochondrialen Dysfunktion aktivierte JNK.

Für den Topoisomerase II Inhibitor Etoposid wurde eine von der induzierten Apoptose unabhängige Aktivierung der JNK nachgewiesen<sup>180</sup>. Dies stützt bei unserer Ergebnislage die Bedeutungslosigkeit der JNK für die Apoptose-induktion durch Ajoen: Zellen, die konstitutiv eine dominant-negative Form der JNK1 exprimieren, reagierten genauso sensitiv auf Ajoen wie die Kontrollzellen.

Welche Bedeutung könnte also der JNK-Aktivierung in der Apoptoseinduktion durch Ajoen zufallen? Chen et al.<sup>144</sup> stellen die Dauer der JNK-Aktivierung als einen bedeutenden Faktor in der Entscheidung zwischen Zellproliferation und Zelltod heraus: Dabei schien eine persistente JNK-Aktivierung (> 1-2 h) zur

Todesinduktion nötig zu sein. In HL-60 Zellen hielt die JNK-Aktivierung über 5 h an, und trotzdem war die JNK nicht im Ajoen-induzierten Zelltod involviert, d.h. eine persistente JNK-Aktivierung ist nicht die einzig zu erfüllende Bedingung.

Isothiocyanate rufen eine dauerhafte Aktivierung der JNK hervor und induzieren Apoptose in verschiedenen Zelltypen<sup>70</sup>. Isothiocyanate induzierten Apoptose, ohne dabei eine Aktivierung von Caspasen zu verursachen, ein bemerkenswerter Unterschied zum Ajoen, bei dem die Apoptose eindeutig von der Aktivierung von Caspasen abhing. Weiterhin zeigten die Arbeiten eine Induktion der Isothiocyanat Wirkung über oxidativen Stress, wie dies bei Ajoen auch der Fall ist. Im Gegensatz zu Ajoen aber war die JNK-Aktivierung zur Todesinduktion bei Isothiocyanaten nötig: In Bcl-2 transfizierten Zellen erfolgte eine verringerte Aktivierung der JNK. Bcl-2 schien hier ein Regulator „upstream“ der JNK-Aktivierung und damit der Apoptose zu sein. Für die Ajoen-aktivierte JNK konnten wir klar zeigen, dass ihre Aktivierung durch die Überexpression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins nicht beeinflusst werden konnte.

Verallgemeinernd lässt sich also sagen: der Stimulus, der zur ROS-Entstehung führt und die Kinetik der Aktivierung haben einen Einfluss auf den Signalweg und auf die Notwendigkeit der JNK-Aktivierung für die Apoptose.

Die Bedeutung der p38 MAPK für die Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es gibt Untersuchungen, die die Beteiligung der p38 MAPK bei einer Reihe von verschiedenen Zelltypen in Apoptoseabläufen belegen: Zum Beispiel bei Apoptoseinduktion durch Wachstumsfaktorentzug<sup>181</sup>, Ischämie<sup>182</sup> und oxidativem Stress<sup>183</sup>. Andererseits zeigten verschiedene Arbeitsgruppen die Bedeutungslosigkeit der p38 MAPK für die Signaltransduktion<sup>184-186</sup>.

Der Einsatz eines spezifischen p38 Inhibitors im Versuchsansatz für Ajoen ließ erkennen, dass die Aktivierung der p38 MAPK in der Ajoen-induzierten Apoptose nicht entscheidend in der Signaltransduktion involviert ist.

Galan et al.<sup>187</sup> bewiesen hingegen eine Involvierung der p38 MAPK in der durch Cadmium induzierten Apoptose. Cadmium führte zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung und p38 Phosphorylierung nach 30 min. Im Fall von Ajoen erfolgte die ROS-Generierung und die Aktivierung innerhalb von 5 min nach Ajoen-Exposition.

Galan et al.<sup>187</sup> diskutierten für die p38 eine Rolle als Signalvermittler in der intrazellulären Oxidation durch Cadmium, weil der SB 203580 Inhibitor nicht nur die p38-Aktivierung hemmte und die Apoptoserate verminderte sondern auch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation unterband. Dies lässt die p38 MAPK als einen regulatorischen („upstream“) Faktor in der Cadmium-induzierten Apoptose erkennen.

Für die Ajoen-induzierte Apoptose konnte hingegen keine Beteiligung festgestellt werden.

Weiterhin untersuchten wir die Rolle der ERK1/2, einer dritten MAPK.

Durch Verwendung von spezifischen MEK Hemmern gelang eine Blockierung der schnellen ERK1/2-Aktivierung (bereits nach 5 min) durch Ajoen. Dies wirkte sich in einer erhöhten Apoptoserate aus. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Berichten von MacKeigan et al.<sup>153</sup>, die die Rolle der ERK1/2 in mit Paclitaxel behandelten Tumorzellen untersuchten. Die ERK1/2-Aktivierung wirkt offensichtlich der apoptotischen Wirkung von Ajoen entgegen und so als anti-apoptotischer Faktor. Die Inaktivierung der ERK1/2 durch spezifische Inhibitoren und damit die Sensitivierung von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika eröffnet eine neue strategische Option im Kampf gegen Krebs.

Unter diesem Aspekt untersuchten wir eine zweite Kinase, die vor allem in der Kontrolle von Überleben und Tod eine wichtige Rolle spielt. Wir zeigten eine Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Ajoen. Tang et al.<sup>154</sup> wiesen eine Aktivierung der Akt durch Etoposid nach. In anderen Arbeiten verhinderte Akt Apoptose durch Eingriff in die Signalkaskade „upstream“ der Mitochondrien vor der Cytochrom c-Freisetzung<sup>188</sup>, oder durch Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad<sup>189,190</sup>.

Diese Aspekte legen eine Verstärkung der apoptotischen Antwort durch eine Hemmung der Akt-Aktivierung nahe. Der Sachverhalt wurde bereits für die zwei Apoptose-induzierenden Verbindungen untersucht, für Etoposid und Staurosporin, die Apoptose über einen intrinsischen Signalweg, wie Ajoen, induzieren: Tang et al. zeigten eine Verstärkung der apoptotischen Antwort, die durch Staurosporin und Etoposid induziert war; dabei hemmten sie die Akt Kinase mit Wortmannin<sup>154</sup>.

Unsere Versuche konnten dies jedoch für Ajoen nicht verifizieren. Vergleicht man die Zeitpunkte der Aktivierungen, so führte die Behandlung mit Etoposid



und Staurosporin zu einer späten (nach 2 h Exposition), aber persistenten Aktivierung der Akt. Bei uns hingegen kam es zu schneller Aktivierung der Akt, innerhalb von 5 min, und zu schneller Abnahme. Dieser Unterschied im Zeitrahmen der Aktivierung und der Aktivierungsdauer zwischen Ajoen und Etoposid/Staurosporin ist ein Hinweis auf eine potentielle andere Bedeutung der Akt in der Ajoen-induzierten Apoptose. Welche Zusammenhänge dahinter stehen könnten, bedürfte noch weiterer Untersuchungen.

Nach unseren Ergebnissen werden die MAPK durch Ajoen aktiviert. Obwohl der JNK eine Rolle bei den Mitochondrien-abhängigen Signalwegen zugewiesen wird, stellten wir fest, dass die JNK für die Ajoen-induzierte Apoptose nicht benötigt wird. Die Notwendigkeit der p38-Aktivierung für die Apoptose wird ebenfalls in der Literatur kontrovers diskutiert. Unsere Daten unterstützen die Annahme der Bedeutungslosigkeit der p38-Aktivierung für die Ajoen-induzierte Apoptose. Wahrscheinlich ist die Notwendigkeit einer JNK- oder p38-Aktivierung für die Apoptosetransduktion über Mitochondrien und Cytochrom c-Freisetzung stark vom Stimulus und vom Zelltyp abhängig. Die Aktivierung beider Kinasen ohne Bedeutung für die Ajoen-Signaltransduktion führt zur Vermutung einer Beteiligung anderer Signalwege, z.B. der Signalweg der Differenzierung oder Proliferation. Dieser spekulative Zusammenhang wäre im Einklang mit Beobachtungen nach Giemsa-Färbung: Dabei entstand der Eindruck der auffälligen Anhäufung von Zellen in der G<sub>2</sub>/Mitosephase. Allerdings ließ sich der Eindruck durch FACS-Analysen nicht bestätigen. Diese sich widersprechenden Beobachtungen könnten ihre Erklärung in den morphologischen Veränderungen am Zellkern finden: Die andiskutierten Membraneffekte bei der TEM-Interpretation (Kernmembran dilatiert und wird lappig) täuschen möglicherweise eine Mitose vor. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass der Signalweg der Differenzierung und Proliferation, wie er für andere Knoblauchinhaltsstoffe bereits gezeigt wurde, „angeschaltet“ wird, aber von den apoptotischen Ereignissen eingeholt und überwältigt wird. Dies könnte zumindest eine Erklärung für die Aktivierung der ERK1/2 Kinasen und die Akt Kinase sein.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit wurde durch den SFB 369 (Teilprojekt B7) unterstützt. Sie sollte auf Basis der bereits vorliegenden Erkenntnisse klären, welcher Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Ajoen in HL-60 Zellen zu Grunde liegt. Dirsch et al.<sup>5</sup> zeigten bereits 1998, dass Ajoen Apoptose in humanen akut-myeloischen Leukämiezellen (HL-60) induziert. Weiterhin zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). N-Acetylcystein (NAC), ein Antioxidans, verhinderte partiell die Ajoen-induzierte ROS-Produktion und die Apoptose.

Auf dieser Grundlage konnten folgende Ergebnisse erarbeitet werden:

- 1) Ajoen verursacht in HL-60 Zellen die Aktivierung der Caspase-3 sowie der Caspase-8. Eine generelle Aktivierung von Caspasen ist für die Ajoen-induzierte Apoptose nötig, da der Breitbandcaspaseinhibitor z-VAD-fmk die durch Ajoen provozierte DNA-Fragmentation völlig verhindert.
- 2) Die Ajoen-induzierte Apoptose wird nicht durch den Todesrezeptor CD95 vermittelt. Dafür sprechen folgende Ergebnisse:
  - a) Unsere HL-60 Zellen exprimieren den CD95-Rezeptor, jedoch kann der natürliche CD95-Ligand (CD95L) keine Apoptose hervorrufen. Wahrscheinlich ist der CD95-Rezeptor inaktiv.
  - b) Außerdem kann für die Caspase-8, die für die Signalweiterleitung vom CD95-Rezeptor u.a. mit verantwortlich ist, durch Einsatz eines spezifischen Caspase-8 Inhibitors keine Bedeutung für die Ajoen-induzierten Apoptose gezeigt werden.
  - c) CD95-resistente Jurkat Zellen (Jurkat<sup>R</sup>) sind auf Ajoen genauso empfindlich wie die Kontrollzellen.
- 3) Es konnte bewiesen werden, dass Ajoen Apoptose über den mitochondrialen Signalweg induziert:
  - a) Ajoen verursacht sowohl den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials der inneren Membran als auch eine Cytochrom c-Freisetzung aus dem intermembranären Spalt.

- b) Die Ajoen-induzierte Apoptose hängt von der provozierten mitochondrialen Dysfunktion ab: HL-60 Zellen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, sind vor Apoptose geschützt.
- c) Die höhere Sensitivität der HL-60/neo bzw. die niedrigere Sensitivität der HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen auf Ajoen konnte auch morphologisch durch TEM-Untersuchungen untermauert werden.

Zusammenfassend konnte also für die Ajoen-induzierte Apoptose eine von Mitochondrien abhängige Signalweiterleitung gezeigt werden.

- 4) Untersuchungen zur Frage, wie es zur Ajoen-induzierten mitochondrialen Dysfunktion kommt, brachten folgende Erkenntnisse:
  - a) Eine Aktivierung von Caspasen ist für die Auslösung der mitochondrialen Ereignisse nicht notwendig. Die abgeschwächte und verzögerte Caspaseaktivierung in HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen beweist: Caspasen werden „downstream“ der mitochondrialen „Aktivierung“ gespalten.
  - b) Die ROS-Entstehung ist ein Ereignis vor („upstream“) der mitochondrialen Dysfunktion.
  - c) Die folgerichtige Untersuchung der MAPK JNK, p38 und ERK1/2 (die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 war bereits bekannt), ergab deren Aktivierung, jedoch ist diese für die Signalvermittlung nicht nötig. Nur für die ERK1/2 Kinase konnte eine direkte Beteiligung, und zwar als „survival“-Faktor, festgestellt werden, während die Akt als „survival“-Faktor keine Bedeutung hat.

Ergebnisübersicht:

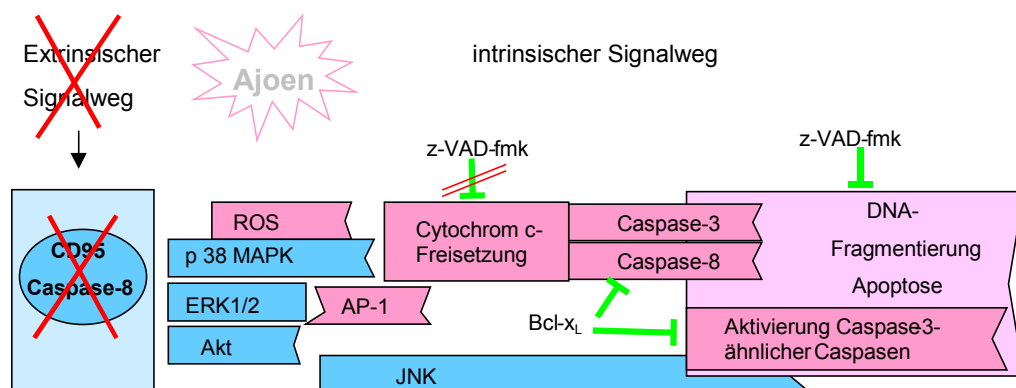


Abb. 61: Ergebnisübersicht

Rot: -- Involvierung im Signalweg, blau: -- kein kausaler Zusammenhang gegeben;  
 -/ = Hemmung.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Wattenberg, L.W., Sporn, V.L. & Barany, G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res.* **49**, 2689-2692 (1989).
2. Weisenberger, A.S., Pensky, J. Tumor inhibition by a sulfhydryl-blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Cancer research* **18**, 1301-1308 (1958).
3. DiPaolo, J.A. & Carruthers, C. The effect of allicin from garlic on tumor growth. *Cancer research* **20**, 431 (1960).
4. Scharfenberg, K., Wagner, R. & Wagner, K.G. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer Lett.* **53**, 103-108 (1990).
5. Dirsch, V.M., Gerbes, A.L. & Vollmar, A.M. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappaB. *Mol. Pharmacol.* **53**, 402-407 (1998).
6. Collin, R. Recherches cytologiques sur le developement de la cellule nerveuse. *Nevraxe* **8**, 181-307 (1906).
7. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
8. Mori, C. *et al.* Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat. Rec.* **242**, 103-110 (1995).
9. Krammer, P.-H. Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord. *Pharmazie in unserer Zeit* **25.Jhrg.**, 306-310 (1996).
10. Spencer, S.J., Cataldo, N.A. & Jaffe, R.B. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol. Surv.* **51**, 314-323 (1996).
11. Offen, D., Elkon, H. & Melamed, E. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm. Suppl* 153-166 (2000).
12. Eguchi, K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern. Med.* **40**, 275-284 (2001).
13. Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 299-306 (1997).
14. Thornberry, N.A. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol.* **244**, 615-631 (1994).
15. Wang, Z.Q. *et al.* Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* **9**, 509-520 (1995).
16. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556 (1980).
17. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
18. Stennicke, H.R. & Salvesen, G.S. Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**, 17-31 (1998).

19. Kumar,S. Apoptosis: Biology and Mechanisms. Springer-Verlag.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
20. Zimmermann, K.C., Bonzon, C. & Green, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* **92**, 57-70 (2001).
21. Wolf, B.B. & Green, D.R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 20049-20052 (1999).
22. Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424 (1999).
23. Chang, H.Y. & Yang, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 821-846 (2000).
24. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-290 (1999).
25. Takahashi, A. & Earnshaw, W.C. ICE-related proteases in apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 50-55 (1996).
26. Casciola-Rosen, L. *et al.* Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.* **183**, 1957-1964 (1996).
27. Kumar, S. Apoptosis: Mechanisms and Role in Disease. Springer-Verlag.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
28. Gupta, S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* **69**, 2957-2964 (2001).
29. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795 (2000).
30. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. & Peter, M.E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 1541-1548 (1999).
31. Nagata, S. Apoptosis mediated by the Fas system. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **16**, 87-103 (1996).
32. Schmitz, I., Kirchhoff, S. & Krammer, P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1123-1136 (2000).
33. Friesen, C., Fulda, S. & Debatin, K.M. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* **13**, 1854-1858 (1999).
34. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
35. Takahashi, T. *et al.* Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-976 (1994).
36. Lenardo, M. *et al.* Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 221-253 (1999).
37. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687 (1998).
38. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).

39. Kaufmann,S.H. & Hengartner,M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* **11**, 526-534 (2001).
40. Martinou,J.C. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* **399**, 411-412 (1999).
41. Martinou,J.C. & Green,D.R. Breaking the mitochondrial barrier. *Mol. Cell Biol.* **2**, 63-71 (2001).
42. Kroemer,G. & Reed,J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513-519 (2000).
43. Bernardi,P., Scorrano,L., Colonna,R., Petronilli,V. & Di Lisa,F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J Biochem.* **264**, 687-701 (1999).
44. Crompton,M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J* **341** ( Pt 2), 233-249 (1999).
45. Newmeyer,D.D., Farschon,D.M. & Reed,J.C. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **79**, 353-364 (1994).
46. Narita,M. *et al.* Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14681-6 (1998).
47. Lorenzo,H.K., Susin,S.A., Penninger,J. & Kroemer,G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase- independent effector of cell death. *Cell Death. Differ.* **6**, 516-524 (1999).
48. Zou,H., Li,Y. , Liu,X. & Wang,X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol. Chem.* **274**, 11549-11556 (1999).
49. Goldstein,J.C., Waterhouse,N.J., Juin,P., Evan,G.I. & Green,D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* **2**, 156-162 (2000).
50. Tsujimoto,Y., Cossman,J., Jaffe,E. & Croce,C.M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-1443 (1985).
51. Adams,J.M. & Cory,S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
52. Antonsson,B. & Martinou,J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57 (2000).
53. Muchmore,S.W. *et al.* X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341 (1996).
54. Yang,J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [see comments]. *Science* **275**, 1129-32 (1997).
55. Maundrell,K. *et al.* Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J. Biol. Chem.* **272**, 25238-25242 (1997).
56. Yamamoto,K., Ichijo,H. & Korsmeyer,S.J. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8469-8478 (1999).
57. Shiah,S.G., Chuang,S.E., Chau,Y.P., Shen,S.C. & Kuo,M.L. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res.* **59**, 391-398 (1999).

58. Commoner, B., Townsend, J. & Pake, G.E. Free radicals in biological materials. *Nature* **174**, 689-691 (1954).
59. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298-300 (1956).
60. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**, 47-95 (2002).
61. Hancock, J.T., Desikan, R. & Neill, S.J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 345-350 (2001).
62. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**, 527-605 (1979).
63. Droge, W. *et al.* Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* **8**, 1131-1138 (1994).
64. Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. & Herrlich, P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**, 5314-5325 (1996).
65. Meyer, M., Schreck, R. & Baeuerle, P.A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**, 2005-2015 (1993).
66. Galter, D., Mihm, S. & Droge, W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* **221**, 639-648 (1994).
67. Dumont, A. *et al.* Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**, 747-757 (1999).
68. Whitmarsh, A.J. & Davis, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol. Med.* **74**, 589-607 (1996).
69. Shiah, S.G., Chuang, S.E., Chau, Y.P., Shen, S.C. & Kuo, M.L. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res.* **59**, 391-398 (1999).
70. Chen, Y.R., Wang, W., Kong, A.N. & Tan, T.H. Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. *J. Biol. Chem.* **273**, 1769-1775 (1998).
71. Watabe, M., Takeya, H. & Osada, H. Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis. *Oncogene* **18**, 5211-5220 (1999).
72. Zhuang, S., Demirs, J.T. & Kochevar, I.E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **275**, 25939-25948 (2000).
73. Lewis, T.S., Shapiro, P.S. & Ahn, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* **74**, 49-139 (1998).
74. Garrington, T.P. & Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 211-218 (1999).
75. Cobb, M.H. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 479-500 (1999).

76. Fukunaga,K. & Miyamoto,E. Role of MAP kinase in neurons. *Mol. Neurobiol.* **16**, 79-95 (1998).
77. Ichijo,H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093 (1999).
78. Block,E. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* **252**, 114-119 (1985).
79. Block,E., Ahmad,S., Catalfamo,J.L., Jain,M.K. & Apitz-Castro,R. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, machanistic and synthetic studies. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7045 (1986).
80. Jain,M.a.A.-C.R. *Trends in Biolchemical Sciences* **12**, 252-254 (1987).
81. Wagner,H. Pharmazeutische Biologie 2, Drogen und ihre Inhaltsstoffe. 5., neu bearbeitete Auflage. 1993. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
82. Scharfenberg K. Ajoen, ein natürliches Cytostatikum; Einfluß auf die Zellproliferation in vitro kultivierter Zellen und Untersuchungen zum Wirkmechanismus. 1991.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
83. Agarwal,K.C. Therapeutic Actions of Garlic constituents. *Medical research reviews* **16**, 111-124 (1996).
84. You,W.C. *et al.* Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 162-164 (1989).
85. You,W.C. *et al.* Diet and high risk of stomach cancer in Shandong, China. *Cancer Res.* **48**, 3518-3523 (1988).
86. Buiatti,E. *et al.* A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int. J. Cancer* **44**, 611-616 (1989).
87. Boone,C.W., Kelloff,G.J. & Steele,V.E. Natural history of intraepithelial neoplasia in humans with implications for cancer chemoprevention strategy. *Cancer Res.* **52**, 1651-1659 (1992).
88. Sumiyoshi,H. & Wargovich,M.J. Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res.* **50**, 5084-5087 (1990).
89. Hong,J.Y. *et al.* Metabolism of carcinogenic nitrosamines by rat nasal mucosa and the effect of diallyl sulfide. *Cancer Res.* **51**, 1509-1514 (1991).
90. Lau,B.H.S., Tadi,P.P. & Tosk,J.M. Allium sativum (garlic) and cancer prevention. *Nutr. Res.* **10**, 937 (1990).
91. Takeyama,H., Hoon,D.S., Saxton,R.E., Morton,D.L. & Irie,R.F. Growth inhibition and modulation of cell markers of melanoma by S-allyl cysteine. *Oncology* **50**, 63-69 (1993).
92. Sundaram,S.G. & Milner,J.A. Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *J. Nutr.* **126**, 1355-1361 (1996).
93. Welch,C., Wuarin,L. & Sidell,N. Antiproliferative effect of the garlic compound S-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.* **63**, 211-219 (1992).
94. Kwon,K.B. *et al.* Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 41-47 (2002).
95. Pinto,J.T. & Rivlin,R.S. Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *J. Nutr.* **131**, 1058S-1060S (2001).



96. Milner, J.A. A historical perspective on garlic and cancer. *J. Nutr.* **131**, 1027S-1031S (2001).
97. Wong, W.W., Macdonald, S., Langler, R.F. & Penn, L.Z. Novel synthetic organosulfur compounds induce apoptosis of human leukemic cells. *Anticancer Res.* **20**, 1367-1374 (2000).
98. Apitz-Castro, R. *et al.* Evidence for direct coupling of primary agonist-receptor interaction to the exposure of functional IIb-IIIa complexes in human blood platelets. Results from studies with the antiplatelet compound ajoene. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 269-280 (1991).
99. Tatarintsev, A.V. *et al.* Ajoene antagonizes integrin-dependent processes in HIV-infected T-lymphoblasts. *AIDS* **6**, 1215-1217 (1992).
100. Romano, E.L. *et al.* Effects of Ajoene on lymphocyte and macrophage membrane-dependent functions. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **19**, 15-36 (1997).
101. Peter, M.E. *et al.* APO-1 (CD95)-dependent and -independent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines. *Int. Immunol.* **7**, 1873-1877 (1995).
102. Burri, S.H. *et al.* 'Loop' domain deletional mutant of Bcl-xL is as effective as p29Bcl-xL in inhibiting radiation-induced cytosolic accumulation of cytochrome c (cyt c), caspase-3 activity, and apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **43**, 423-430 (1999).
103. Derijard, B. *et al.* JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1037 (1994).
104. Walczak, H., Bouchon, A., Stahl, H. & Krammer, P.H. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res.* **60**, 3051-3057 (2000).
105. Dirsch, V.M., Stuppner, H. & Vollmar, A.M. Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-x(L) or Bcl-2. *Cancer Res.* **61**, 5817-5823 (2001).
106. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63 (1983).
107. Darzynkiewicz, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**, 795-808 (1992).
108. Studzinski, G.P. Cell Growth and Apoptosis, a practical approach. Rickwood, D. and Hames, B. D. 1995. Oxford University Press.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
109. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271-279 (1991).
110. Reers, M. *et al.* Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* **260**, 406-417 (1995).
111. Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. & Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* **411**, 77-82 (1997).
112. Smiley, S., Reers, M. & Mottola-Hartshorn, C. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3671-3675 (1991).

113. Cossarizza,A., Baccarani-Contri,M., Kalashnikova,G. & Franceschi,C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 40-5 (1993).
114. Cossarizza,A. Measure of mitochondrial membrane potential with the fluorescent probe JC-1. *Purdue Cytometry CD-RomSeries volume 3*, (1999).
115. Vollmar,A.M., Forster,R. & Schulz,R. Effects of atrial natriuretic peptide on phagocytosis and respiratory burst in murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **319** , 279-285 (1997).
116. Yang,D., Faris,R., Hixson,D., Affigne,S. & Rogler,C.E. Insulin-like growth factor II blocks apoptosis of N-myc2-expressing woodchuck liver epithelial cells. *J. Virol.* **70**, 6260-6268 (1996).
117. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
118. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
119. Lottspeich,F. & Zorbas,H. Bioanalytik. 1998. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
120. Leist,M., Volbracht,C., Fava,E. & Nicotera,P. 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity, protease activation, and neuronal apoptosis. *Mol. Pharmacol.* **54**, 789-801 (1998).
121. Carthew,R.W., Chodosh,L.A. & Sharp,P.A. An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* **43**, 439-448 (1985).
122. Kiemer,A. Das atriale natriuretische Peptid als autokriner Regulator der induzierbaren NO-Synthase-Untersuchungen zum Molekularen Wirkmechanismus. 62-63. 1997. LMU München.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
123. Robertson,J.D., Gogvadze,V., Zhivotovsky,B. & Orrenius,S. Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J Biol. Chem.* **275**, 32438-32443 (2000).
124. Perkins,C.L., Fang,G., Kim,C.N. & Bhalla,K.N. The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res.* **60**, 1645-1653 (2000).
125. McColl,K.S. *et al.* Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol. Cell Endocrinol.* **139**, 229-238 (1998).
126. Thornberry,N.A. & Lazebnik,Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).
127. Hennino,A., Berard,M., Casamayor-Palleja,M., Krammer,P.H. & Defrance,T. Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol.* **165**, 3023-3030 (2000).
128. Medema,J.P. *et al.* FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* **16**, 2794-2804 (1997).

129. Labroille,G., Dumain,P., Lacombe,F. & Belloc,F. Flow cytometric evaluation of fas expression in relation to response and resistance to anthracyclines in leukemic cells. *Cytometry* **39**, 195-202 (2000).
130. Clement,M.V., Hirpara,J.L., Chawdhury,S.H. & Pervaiz,S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* **92**, 996-1002 (1998).
131. Gajate,C. *et al.* Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int. J Cancer* **85**, 674-682 (2000).
132. Ohashi,M., Iwase,M. & Nagumo,M. Changes in susceptibility to Fas-mediated apoptosis during differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc. Biol.* **67**, 374-380 (2000).
133. Takizawa,T., Tatematsu,C., Ohashi,K. & Nakanishi,Y. Recruitment of apoptotic cysteine proteases (caspases) in influenza virus-induced cell death. *Microbiol. Immunol.* **43**, 245-252 (1999).
134. Martin,D.A., Siegel,R.M., Zheng,L. & Lenardo,M.J. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* **273**, 4345-4349 (1998).
135. Loeffler,M. & Kroemer,G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell Res* **256**, 19-26 (2000).
136. Bratton,S.B., MacFarlane,M., Cain,K. & Cohen,G.M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **256**, 27-33 (2000).
137. Gross,A., McDonnell,J.M. & Korsmeyer,S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911 (1999).
138. Allen,R.T., Cluck,M.W. & Agrawal,D.K. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 427-445 (1998).
139. Armstrong,J.S. *et al.* Bcl-2 inhibits apoptosis induced by mitochondrial uncoupling but does not prevent mitochondrial transmembrane depolarization. *Exp. Cell Res.* **262**, 170-179 (2001).
140. Decaudin,D. *et al.* Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* **57**, 62-67 (1997).
141. Schaeffer,H.J. & Weber,M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2435-2444 (1999).
142. Tournier,C. *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-874 (2000).
143. Butterfield,L., Storey,B., Maas,L. & Heasley,L.E. c-Jun NH2-terminal kinase regulation of the apoptotic response of small cell lung cancer cells to ultraviolet radiation. *J. Biol. Chem.* **272**, 10110-10116 (1997).
144. Chen,Y.R., Wang,X., Templeton,D., Davis,R.J. & Tan,T.H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31929-31936 (1996).
145. Zanke,B.W. *et al.* The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* **6**, 606-613 (1996).

146. Wang,T.H. *et al.* Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells. *J Biol. Chem.* **274**, 8208-8216 (1999).
147. Chen,Y.R., Zhou,G. & Tan,T.H. c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4- hydroxyphenyl)retinamide. *Mol. Pharmacol.* **56**, 1271-1279 (1999).
148. Shiah,S.G., Chuang,S.E. & Kuo,M.L. Involvement of Asp-Glu-Val-Asp-directed, caspase-mediated mitogen- activated protein kinase kinase 1 Cleavage, c-Jun N-terminal kinase activation, and subsequent Bcl-2 phosphorylation for paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells. *Mol. Pharmacol.* **59**, 254-262 (2001).
149. Lali,F.V., Hunt,A.E., Turner,S.J. & Foxwell,B.M. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide- dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol. Chem.* **275**, 7395-7402 (2000).
150. Eilers,A. *et al.* Direct inhibition of c-Jun N-terminal kinase in sympathetic neurones prevents c-jun promoter activation and NGF withdrawal-induced death. *J Neurochem.* **76**, 1439-1454 (2001).
151. Davies,S.P., Reddy,H., Caivano,M. & Cohen,P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J* **351**, 95-105 (2000).
152. Chang,L. & Karin,M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40 (2001).
153. MacKeigan,J.P., Collins,T.S. & Ting,J.P. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 38953-38956 (2000).
154. Tang,D. *et al.* Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J. Biol. Chem.* **276**, 30461-30466 (2001).
155. Ikeyama,S., Kokkonen,G., Shack,S., Wang,X.T. & Holbrook,N.J. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *FASEB J.* **16**, 114-116 (2002).
156. Datta,S.R., Brunet,A. & Greenberg,M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* **13**, 2905-2927 (1999).
157. Zhou,H., Li,X.M., Meinkoth,J. & Pittman,R.N. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol.* **151**, 483-494 (2000).
158. Cohen,G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326 ( Pt 1)**, 1-16 (1997).
159. Liu,X., Zou,H., Slaughter,C. & Wang,X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184 (1997).
160. Friesen,C., Herr,I., Krammer,P.H. & Debatin,K.M. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug- induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* **2**, 574-577 (1996).
161. Seki,T., Tsuji,K., Hayato,Y., Moritomo,T. & Ariga,T. Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer Lett.* **160**, 29-35 (2000).
162. Muller,M. *et al.* Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53 . *J Clin. Invest* **99**, 403-413 (1997).

163. Micheau,O., Solary,E., Hammann,A., Martin,F. & Dimanche-Boitrel,M.T. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas- mediated cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 783-789 (1997).
164. Fulda,S., Strauss,G., Meyer,E. & Debatin,K.M. Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* **95**, 301-308 (2000).
165. Li,H., Zhu,H., Xu,C.J. & Yuan,J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
166. Finucane,D.M., Waterhouse,N.J., Amarante-Mendes,G.P., Cotter,T.G. & Green,D.R. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp. Cell Res.* **251**, 166-174 (1999).
167. Li,F. *et al.* Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* **272**, 30299-305 (1997).
168. Kolenko,V.M., Uzzo,R.G., Bukowski,R. & Finke,J.H. Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis*. **5**, 17-20 (2000).
169. Reed,J.C. *et al.* BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Cell Biochem.* **60**, 23-32 (1996).
170. Bunz,F. Cell death and cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 337-341 (2001).
171. Waters,J.S. *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 1812-1823 (2000).
172. Cotter,F.E., Waters,J. & Cunningham,D. Human Bcl-2 antisense therapy for lymphomas. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 97-106 (1999).
173. Ehler,J.E. & Kubbutat,M.H. Apoptosis and its relevance in cancer therapy. *Onkologie.* **24**, 433-440 (2001).
174. Slee,E.A. *et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *J Cell Biol* **144**, 281-92 (1999).
175. Tang,D., Lahti,J.M. & Kidd,V.J. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 9303-9307 (2000).
176. Susin,S.A., Zamzami,N. & Kroemer,G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 151-165 (1998).
177. Wang,T.H., Wang,H.S. & Soong,Y.K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* **88**, 2619-2628 (2000).
178. Mandlekar,S., Yu,R., Tan,T.H. & Kong,A.N. Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 5995-6000 (2000).
179. Sanchez-Perez,I., Martinez-Gomariz,M., Williams,D., Keyse,S.M. & Perona,R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* **19**, 5142-5152 (2000).

180. Jarvis,W.D. *et al.* Evidence that the apoptotic actions of etoposide are independent of c-Jun/activating protein-1-mediated transregulation. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1384-1392 (1999).
181. Kummer,J.L., Rao,P.K. & Heidenreich,K.A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 20490-20494 (1997).
182. Mackay,K. & Mochly-Rosen,D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J. Biol. Chem.* **274**, 6272-6279 (1999).
183. Oh-hashii,K. *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 504-509 (1999).
184. Stadheim,T.A. & Kucera,G.L. c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for mitoxantrone- and anisomycin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Leukemia Research* **26**, 55-65 (2002).
185. Soh,Y. *et al.* Selective activation of the c-Jun N-terminal protein kinase pathway during 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* **58**, 535-541 (2000).
186. Wong,C.K., Zhang,J.P., Lam,C.W., Ho,C.Y. & Hjelm,N.M. Sodium salicylate-induced apoptosis of human peripheral blood eosinophils is independent of the activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **121**, 44-52 (2000).
187. Galan,A. *et al.* Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol. Chem.* **275**, 11418-11424 (2000).
188. Kennedy,S.G., Kandel,E.S., Cross,T.K. & Hay,N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5800-5810 (1999).
189. del Peso,L., Gonzalez-Garcia,M., Page,C., Herrera,R. & Nunez,G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-689 (1997).
190. Datta,S.R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241 (1997).
191. Fulda,S. *et al.* Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* **273**, 33942-33948 (1998).
192. Ravagnan,L. *et al.* Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene* **18**, 2537-2546 (1999).

## 7 ANHANG

Die nachfolgenden Bildtafeln zeigen die im Text verkleinert eingefügten Aufnahmen der Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie:

---

Zu Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Zellen.

**Anhang 1A:** HL-60 Zellen wurden mit Ajoen (20  $\mu$ M) 0-24 h stimuliert. Nach den angegebenen Zeiten (15 min, 30 min, 4 h, 8 h und 24 h) wurden die Zellen fotografiert. **Kontrolle:** unbehandelte Zellen; **15/30 min:** die Zellen verändern sich an ihrer Oberfläche, einzelne Ausbuchtungen entstehen;

**Anhang 1B:** **4 h/ 8 h:** die ersten Abschnürungen (apoptotische Körperchen) sind zu erkennen (rote Pfeile), daneben ballen sich die Zellen zu Zellverbänden (Cluster, schwarze Pfeile) zusammen; **24 h:** die Zellen sind stark geschrumpft, es liegen hauptsächlich Zellfragmente vor.

---

Zu Abb. 17: Detektion der kondensierten DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie.

**Anhang 2:** HL-60 Zellen wurden mit Ajoen (20  $\mu$ M) für die angegebenen Zeiten stimuliert (0-24 h), mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. **CN:** Kontrolle; Zellen mit schwach blauer Fluoreszenz; vereinzelt Spontanapoptose. **4 h:** Auftreten einer verstärkten Fluoreszenz in den Zellen = DNA-Kondensation (Pfeile); **8 h:** die Zahl der Zellen mit verdichtetem Chromatin nimmt stark zu; **24 h:** nahezu alle Zellen weisen kondensiertes Chromatin auf, der Kern ist stark fragmentiert (Pfeile).

---

Zu Abb. 35: Ajoen induziert einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.

**Anhang 3:** Behandlung von HL-60 Zellen für 8 h mit Ajoen (20  $\mu$ M), Färbung mit JC-1. Anschließende Analyse der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. **Kontrollbedingungen:** rote Fluoreszenz der JC-1 Aggregatform (oberes Bild, intakter elektrochemischer Gradient). **Unteres Bild:** die Grünfluoreszenz entspricht der JC-1 Monomerbildung nach Verlust des Membranpotentials durch Ajoen (20  $\mu$ M, 8 h).

---

---

Zu Abb. 41: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten (ca. 7 nm Schichtdicke) von HL-60/neo Zellen.

**Anhang 4: A1** Nicht stimulierte HL-60/neo (Kontrollen). Die Zellen zeigen ein relativ elektronendichtes Zytoplasma mit typischen Mitochondrien (ZK: Zellkern; F: Lipidkörperchen, M: Mitochondrium).

**A2** Detailaufnahme typischer Mitochondrien. Deutlich sind die Cristae erkennbar (Pfeil).

**B1** Stimulierte HL-60/neo Zellen (Ajoen 20  $\mu$ M, 3 h). Auffällig ist die Schwellung des Lumens des Endoplasmatischen Retikulums (ER), und die Schwellung des Lumens zwischen innerer und äußerer Kernmembran (Pfeil).

**B2** Auftretende Schwellung der Matrix in den Mitochondrien (Pfeile) nach Stimulation.

**C1** Charakteristisch für spätere Stadien sind zahlreiche elektronentransparente Vesikel. Die Kernmembranen dilatieren (Pfeile).

**C2** Auffällige Ko-Lokalisation der Mitochondrien mit Vesikeln (Pfeile).

---

Zu Abb. 42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten von HL-60/bcl-x<sub>L</sub> Zellen.

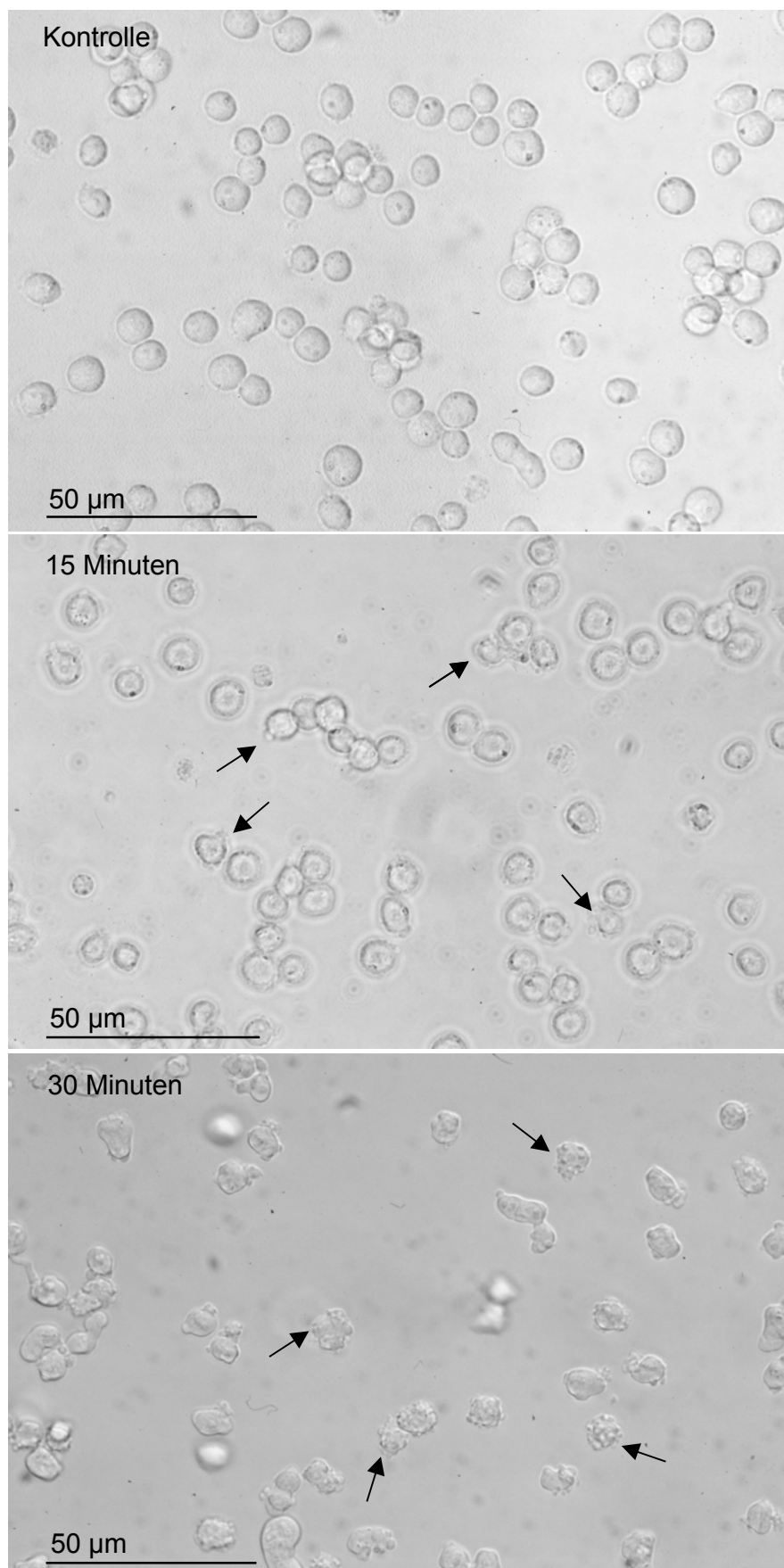
**Anhang 4: D1** HL-60/bcl-x<sub>L</sub> unstimuliert (Kontrolle). Das Zytoplasma erscheint elektronendicht (ZK: Zellkern; F: Lipidkörperchen; M: Mitochondrium).

**D2** Die Membran der Mitochondrien weist im Vergleich zu HL-60/neo (s. A1) einen schwächeren Kontrast auf.

**E1** Der Kontrast der mitochondrialen Membranen nimmt nach Stimulation mit Ajoen (20  $\mu$ M, 3 h) zu; die Schwellung des ER-Lumens ist charakteristisch. **E2** Die Mitochondrien zeigen eine geschwollene Matrix (\*) dadurch elektronentransparenter; Schwellung des ER-Lumens (Ajoen 20  $\mu$ M, 3 h).

---

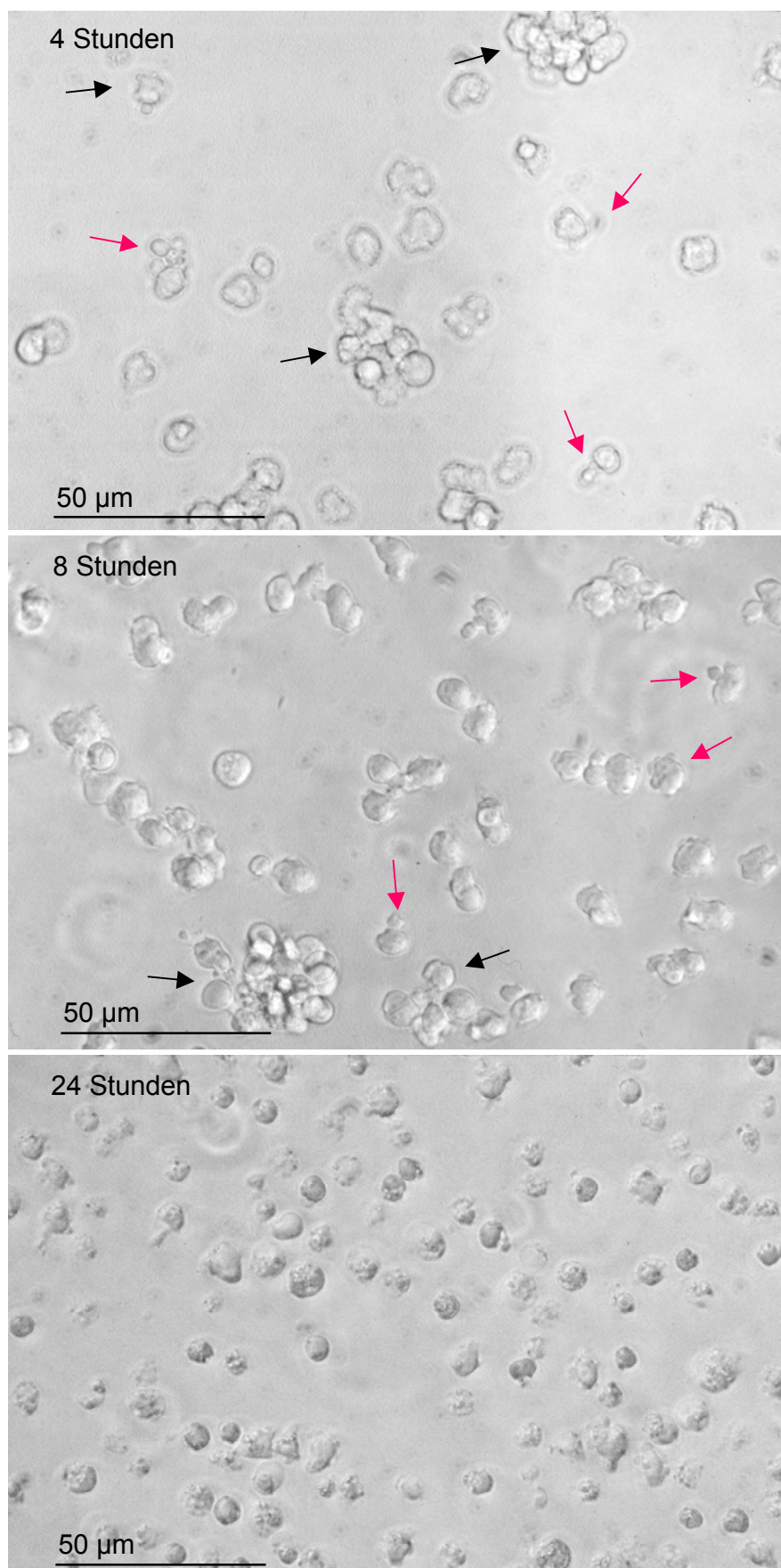




Anhang 1 A

Vergrößerung

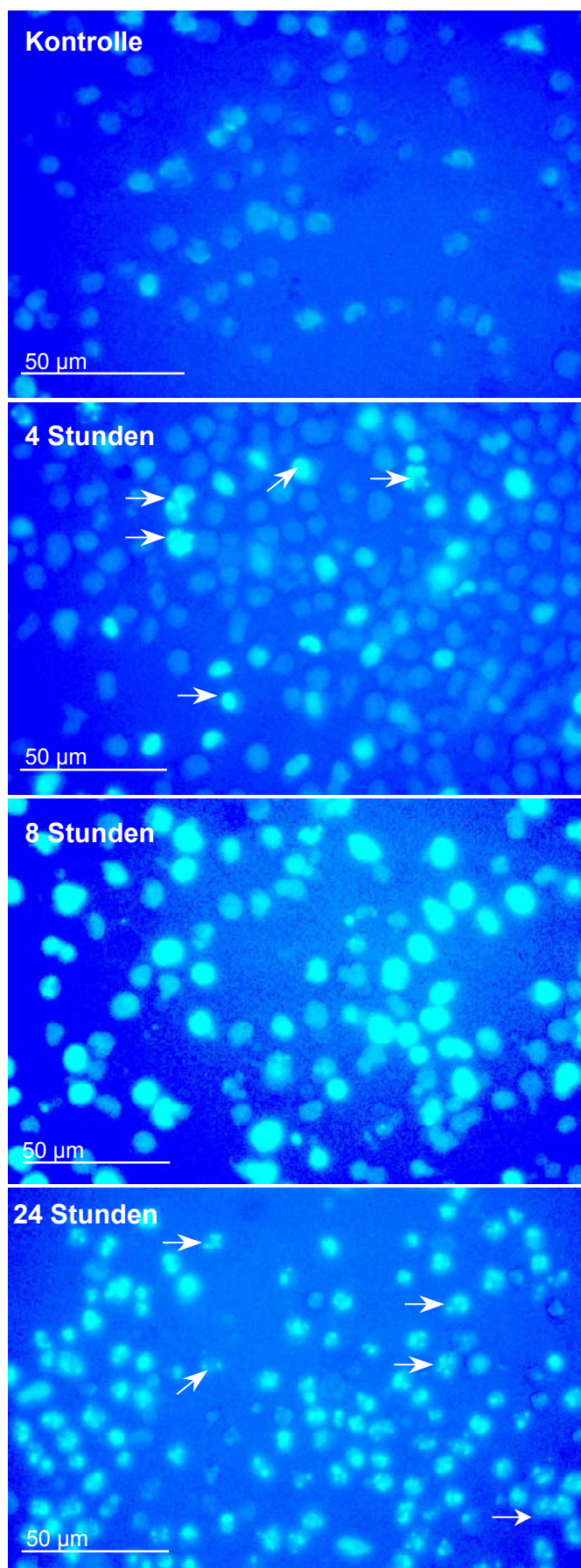
Abb.: 15



Anhang 1 B

Vergrößerung

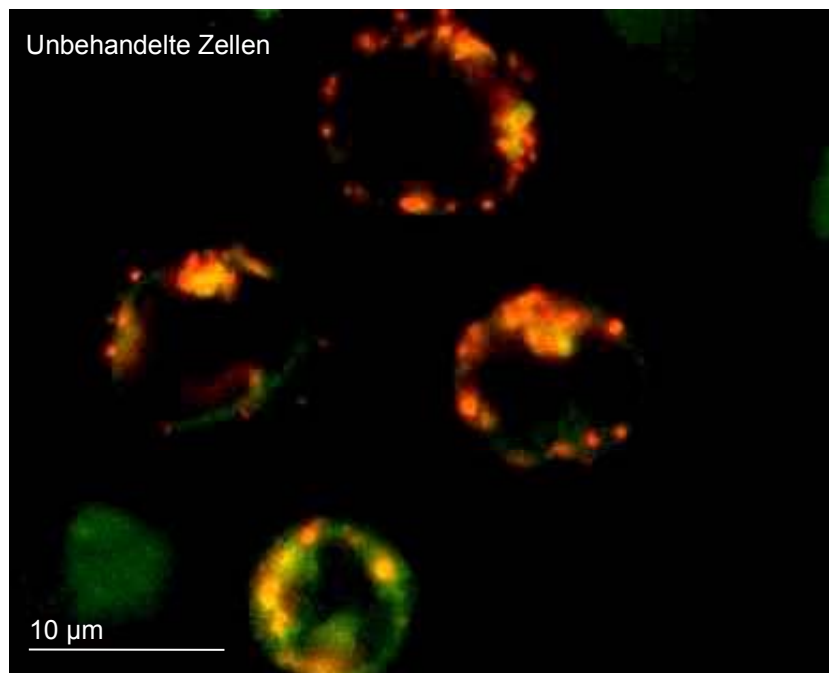
Abb.: 15



Anhang 2

Vergrößerung

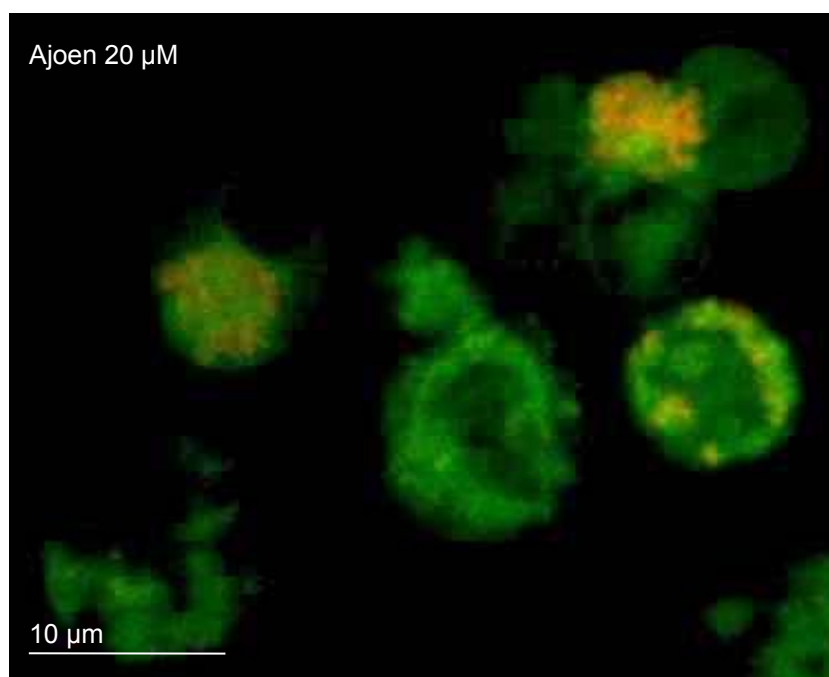
Abb.: 17



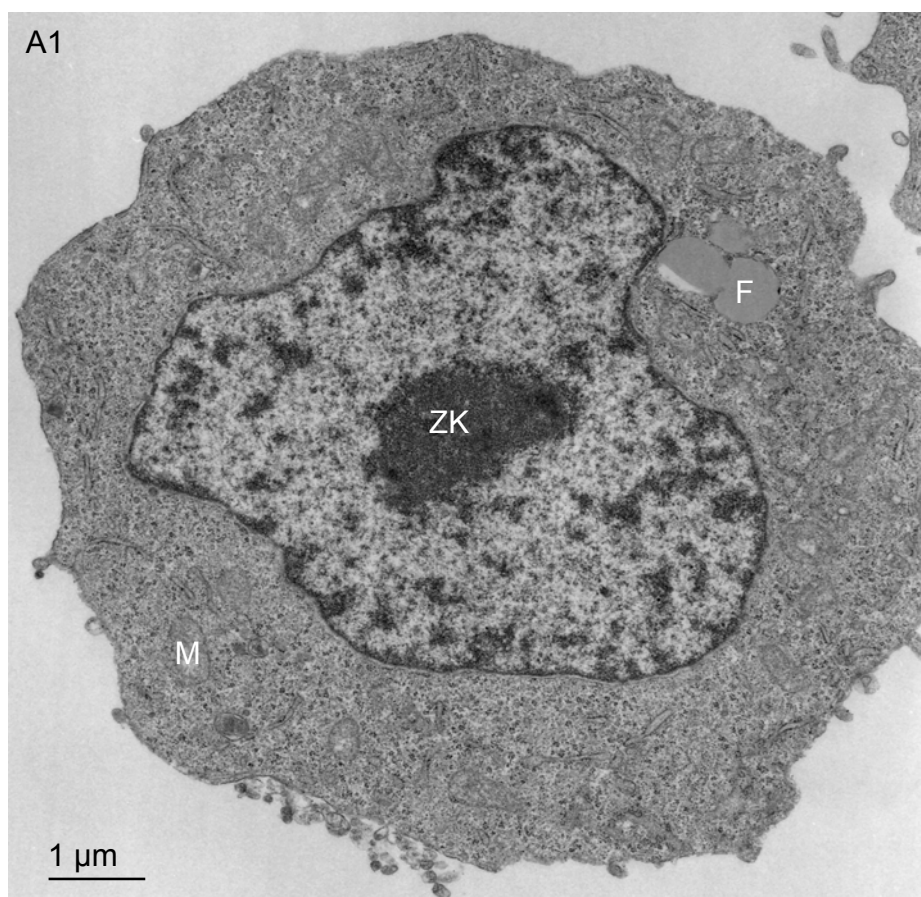
Anhang 3

Vergrößerung

Abb.: 35





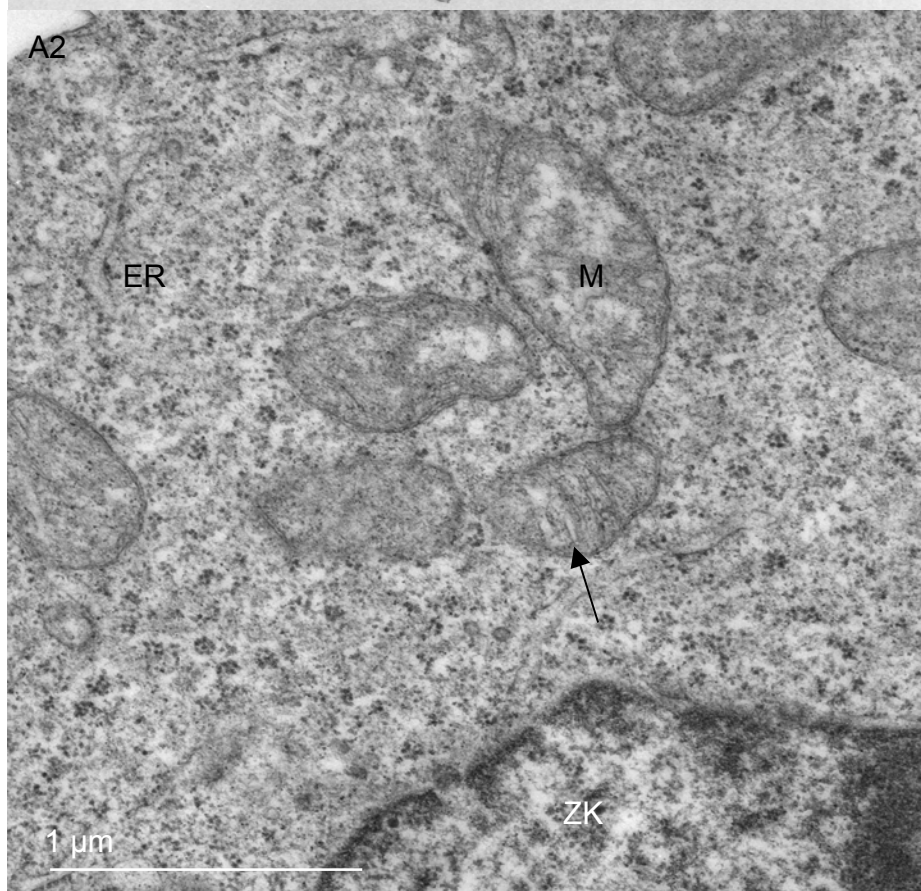


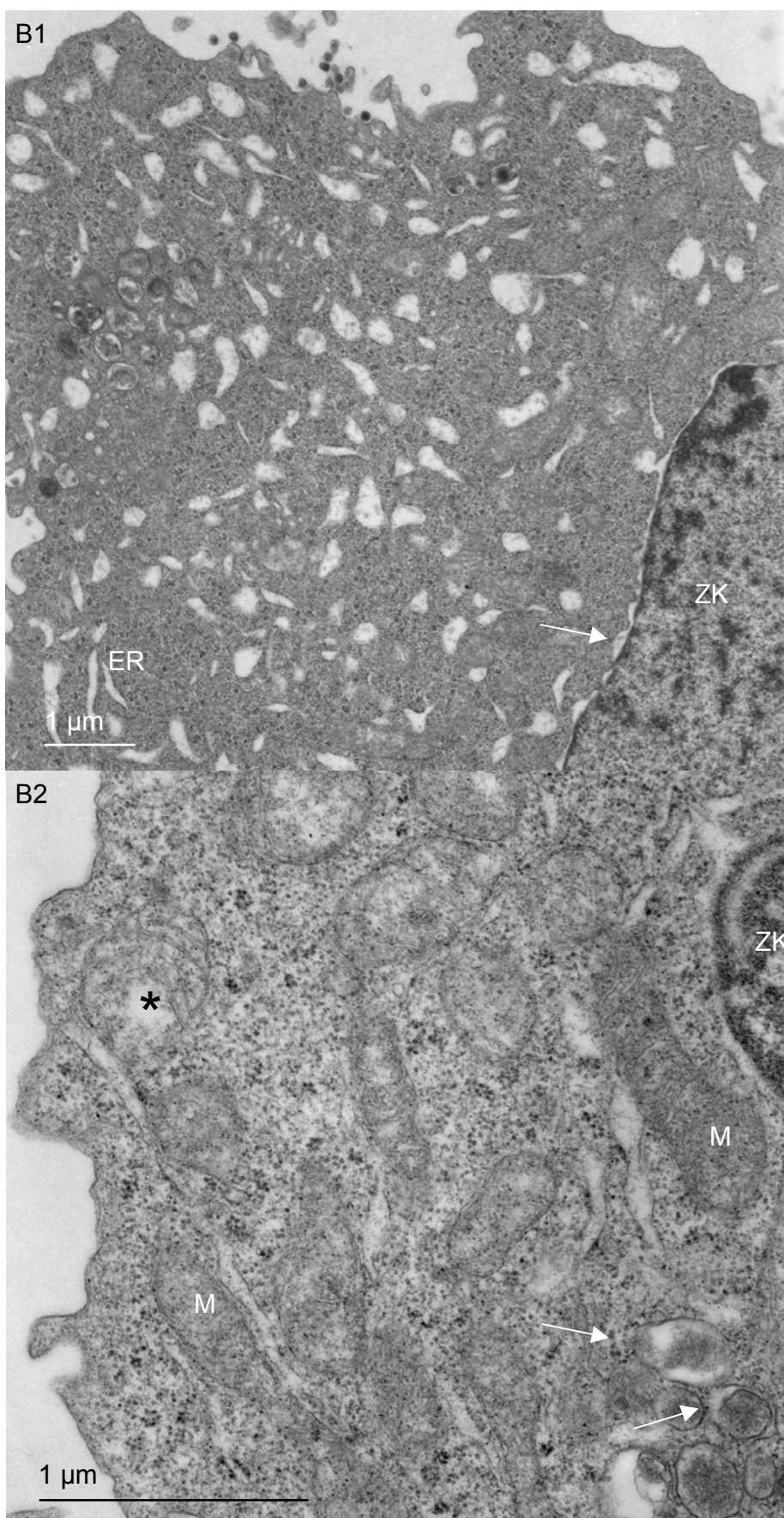
Anhang 4 A

Vergrößerung

Abb. 41

HL-60/neo



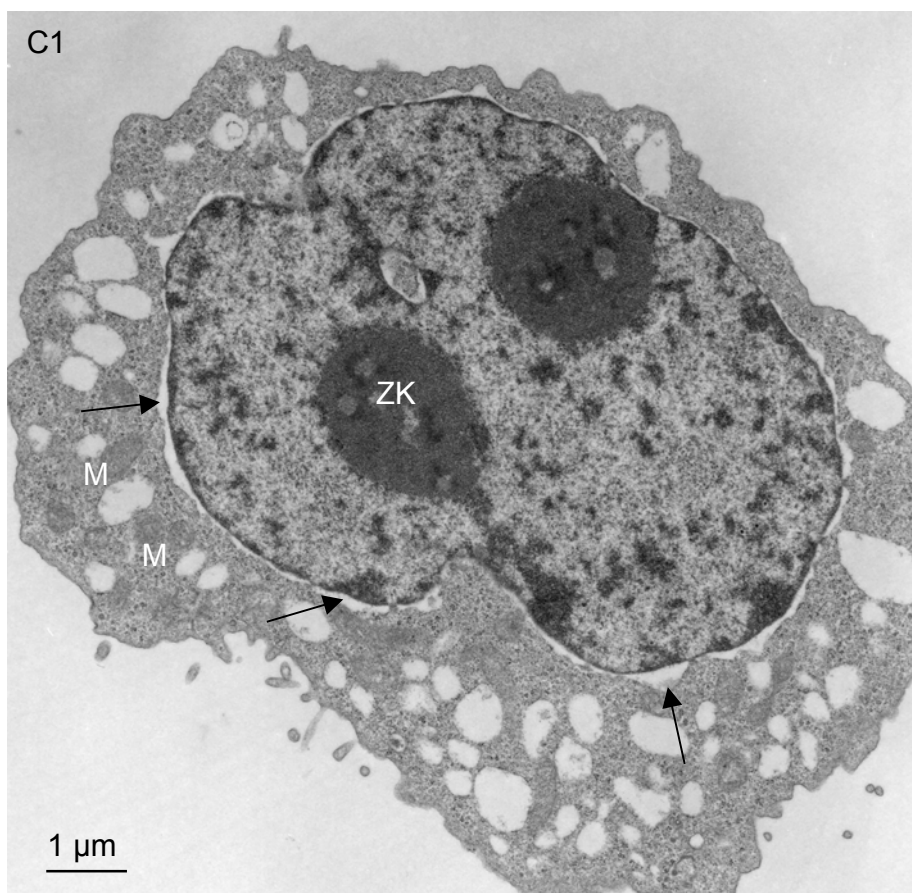


Anhang 4 B

Vergrößerung

Abb. 41

HL-60/neo

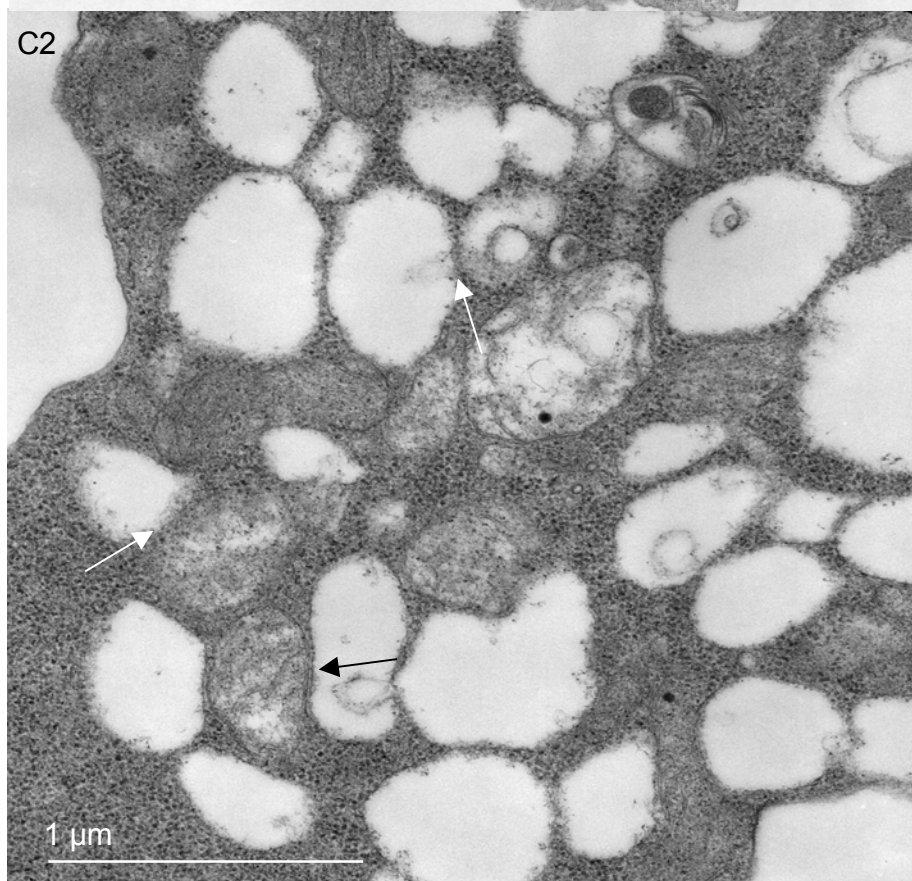


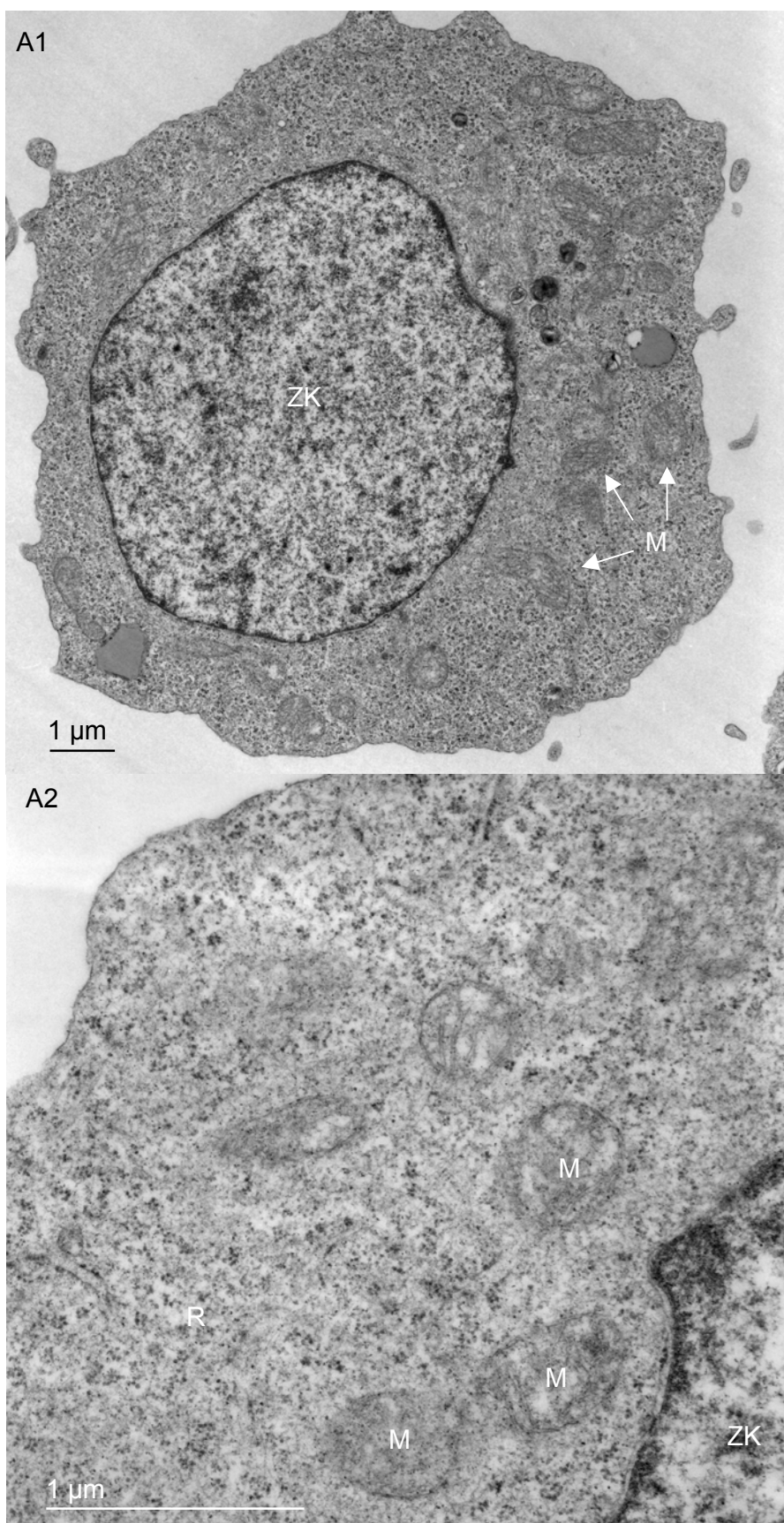
Anhang 4 C

Vergrößerung

Abb. 41

HL60/neo





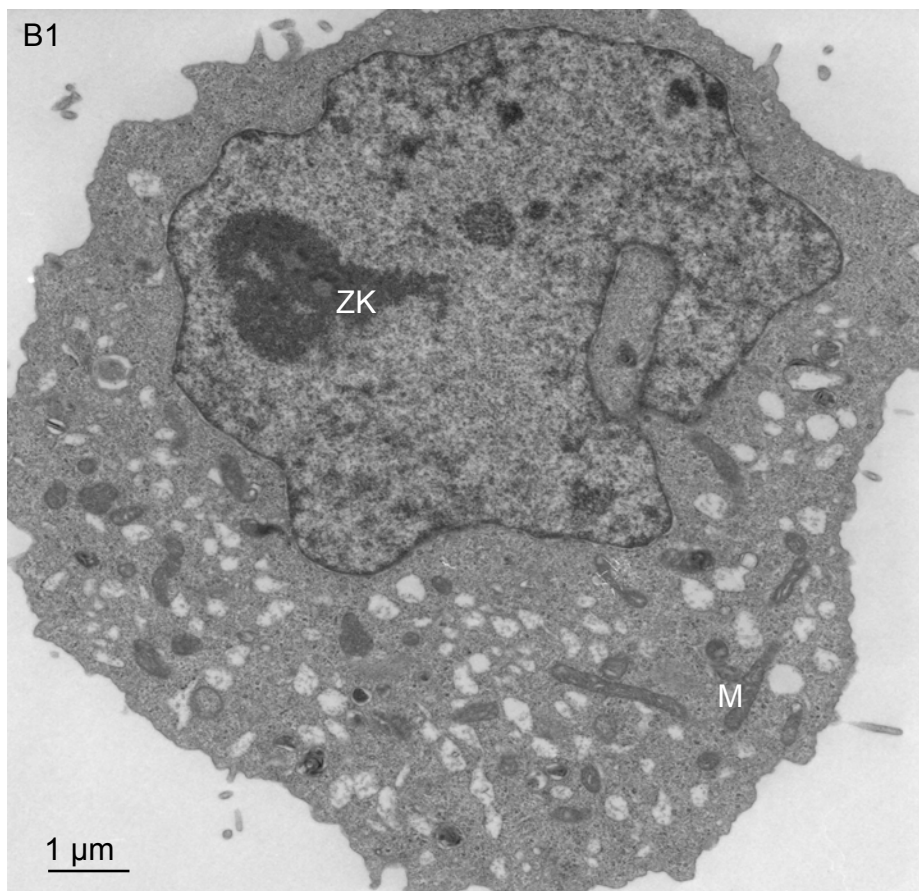
Anhang 4 D

Vergrößerung

Abb. 42

HL-60/bcl-x<sub>L</sub>





Anhang 4 E

Vergrößerung  
Abb. 42HL-60/bcl-x<sub>L</sub>

## 8 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

Name:	<u>Dorothee</u> Susanne Maria Antlsperger
Geburtstag:	22.02.1973
Geburtsort:	München
Eltern:	Dr. Gerard und Maria Antlsperger
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

### Schulbildung

---

1979 - 1983	Grundschule Vaterstetten
1983 - 1992	Gymnasium Vaterstetten
Juli 1992	Abitur am Gymnasium Vaterstetten

### Hochschulstudium und Promotion

---

Nov. 1992 - März 1993	Studium der Chemie (Chemie Diplom) an der Universität Regensburg bis zur Zuweisung eines Studienplatzes der Pharmazie
Mai 1993 - Okt. 1997	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Sept. 1995	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Okt. 1997	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 1997 - April 1998	Pharmaziepraktikantin in der Apotheke des Bezirkskrankenhauses Haar, Akademisches Lehrkrankenhaus der LMU München
Mai 1998 - Oktober 1998	Pharmaziepraktikantin in der Orlando-Apotheke, München
Dezember 1998	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation als Apothekerin
Seit Januar 1999	Promotion (Dr. rer. nat.) im Fachbereich Pharmazeutische Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Fr. Prof. Dr. A. M. Vollmar Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

## Publikationen

- Veröffentlichungen :
- Dirsch, V. M., Antlsperger, D. S. M., Hentze, H., und Vollmar, A. M. (2002) Leukemia **16**, S. 74-78, Ajoene, an experimental antileukemic drug: mechanism of cell death.
- Antlsperger, D. S. M., Dirsch, V. M., Kuo, M. L. und Vollmar, A. M. (2002) Ajoene-induced cell death does not require JNK but is amplified by the inhibition of ERK. Eingereicht.
- Symposien:
2. European Graduate Student Meeting der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Frankfurt, März 2000, Vortrag
42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz (März 2001), Poster
43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz (März 2002), Poster